



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Caracterización de la interacción física y funcional entre el receptor  
de panneurotrofinas p75<sup>NTR</sup> y la inmunofilina Ciclofilina B.

Tesis Doctoral

Mario Ituero Pozo

Madrid, 2013.



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Caracterización de la interacción física y funcional entre el  
receptor de panneurotrofinas p75<sup>NTR</sup> y la inmunofilina  
Ciclofilina B**

Memoria que, para optar al grado de Doctor por la Universidad  
Autónoma de Madrid presenta el Licenciado en Biología

**Mario Ituero Pozo**

Director de la Tesis:

**Dr. José Miguel Cosgaya Manrique**

Científico titular del CSIC

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

CSIC-UAM





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



José Miguel Cosgaya Manrique

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

Arturo Duperier, 4

28029 Madrid, España

Tel: +34 915854477

Fax: +34 915854401

Email: [jmcosgaya@iib.uam.es](mailto:jmcosgaya@iib.uam.es)

El Dr. José Miguel Cosgaya Manrique, científico titular del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM

CERTIFICA:

Que MARIO ITUERO POZO, licenciado en Biología por la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo mi dirección y para la obtención de una Tesis Doctoral el trabajo de investigación titulado:

**“CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN FÍSICA Y FUNCIONAL ENTRE EL RECEPTOR DE PANNEUROTROFINAS p75<sup>NTR</sup> Y LA INMUNOFILINA CICLOFILINA B”**

CONSIDERA:

Que, tanto el trabajo experimental como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y, para que conste a todos los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a XX de Octubre de 2013.

Fdo: Dr. José Miguel Cosgaya Manrique

Director de la Tesis Doctoral

Científico titular del CSIC

IIBM “Alberto Sols”



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols” (CSIC-UAM), bajo la dirección del Dr. José Miguel Cosgaya Manrique.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de la Junta de Ampliación de Estudios (JAE-Predoc), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.





*A mi madre,  
a mi abuelos.*



*“No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas”*

Rita Levi-Montalcini, 1909-2012.



## ***Agradecimientos***

*En primer lugar, quiero agradecer a José Miguel la enorme oportunidad que me dio en su momento para poder realizar esta tesis doctoral bajo su dirección en el laboratorio 1.6.2. Gracias por toda la ayuda prestada y por los consejos durante todos estos años.*

*A todos los compañeros del 1.6.2., sin ningún orden de importancia, gracias a todos por estos años, tanto en lo laboral como en lo personal. Josune, muchas gracias por haberme permitido “gastarte el nombre” tanto tiempo, muchas gracias por los consejos, por convertirme en un padawan del diseño de oligos y, sobre todo, por las tantas risas y bromas absurdas que han hecho tan ameno el camino. Ale, gracias por estar ahí, mano a mano, pipeta a pipeta, gracias por el apoyo moral, y por esos momentos tan divertidos a “cuatro manos” en el animalario. Al resto de personas que han ido pasando por el laboratorio, gracias por todo, gracias Nacho, José Luis, Anita Cañadas (no tanto a sus chistes, pero también...), Yoli y Elena.*

*Muchas gracias a los compañeros del 1.6.1., por tanto material de última hora, consejos científicos, ayuda en protocolos y demás. Pero también muchas gracias por amenizar las tardes y por esas tantas celebraciones conjuntas 1.6. Gracias, Olivier, por estar siempre dispuesto a echar una mano. Antonio, que te pires. Que no... sobra decir nada, simplemente gracias, gracias por esas cervezas, cafés, barritas catalanas, bailes y viajes. En el camino nos encontraremos.*

*A los compañeros “jefes”, siempre ayudando, siempre aconsejando, gracias. Anita, AnaMari o Dra. Jiménez, como prefieras, gracias por las sonrisas. Borja, eres un artista. Muchas gracias a todos por estar siempre presentes y por compartir conmigo tantas comidas y debates. Gracias a Ricardo, Rosa, María Jesús. Gracias también a la Dra. Aranda, por ser tan buena “abuela científica” y por tanto material prestado.*

*A mis compañeros de la Sala de Personal, mil gracias a todos chicos, gracias a vosotros ha sido posible aguantar en los momentos más difíciles y mantener las ganas de seguir y seguir viniendo todos los días a comer con vosotros. Alvarito, ¡gracias gordi! Eres lo más de lo más, ¡y lo sabés!. Eva, gracias por ser así de friki, ¡no estamos solos en el mundo! Gracias, compi. María, es impresionante lo lista, simpática y genial que eres, keep in touch!! Toño, eres genio y figura, gracias tío. Ali y Ángela, muchas gracias por estar ahí, sois geniales. Blanca, ¡Blancookie! Eres un amor de*

*persona, gracias por aparecer. Al resto de gente que ha pasado y ya se han ido, por supuesto no os olvido, muchas gracias a todos. Gracias Daniela, Myri, Rafa (se pronuncia “Rafa”), AnaRosa, Pepa, ... por hacer entre todos la mesa más larga y divertida de la sala de personal, ¡olé!*

*En general, a todos los compañeros del IIB, de otros laboratorios y de los servicios, sobre todo de animalario y microscopía. Muchísimas gracias a todos.*

*En el terreno personal, pero también profesional, Jazmina, muchas gracias por ser mi amiga y compañera. Gracias por todos estos años a mi lado, desde aquellos comienzos de carrera, ¡quien nos diría! Gracias por los años compartidos en Madrid, por esos viajes (vendrán más, ¡¡no lo dudes!!). Te admiro.*

*Por supuesto, muchas gracias a mi versión particular de canarios en Madrid, por recordarme siempre de dónde vengo y como somos. Mil gracias Edu (reverencia), seguiremos siendo callejeros-viajeros, all over the world! Euge, gracias por estar ahí, ¡¡la próxima eres tú!!*

*A todas esas personas que he conocido en Madrid, que también he conocido gracias a esta tesis, y que tanto bien me han hecho y me hacen. Todos (sin nombres, pero no hace falta, ya lo sabéis), estáis incluidos en este trabajo.*

*Sobre todo, si me olvido de alguien, no quiere decir que no lo agradezca, son los días acumulados sin dormir...*

*Y, los últimos serán los primeros, a mi familia, les quiero. Mamá, eres lo más, somos un gran equipo de dos. Mi abuela, los ojos más bonitos del mundo, eres el Sol para mí. Mi abuelo, gracias por quererme tanto, gordo. La familia que yo he elegido, Carlos y Raquel, también forman parte de esto, gracias.*







## ***Resumen.***

Las neurotrofinas son factores de crecimiento con un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de las funciones del Sistema Nervioso, participando en decisiones de supervivencia/muerte celular, diferenciación y en procesos más complejos como la mielinización y la migración celular. Ejercen sus respuestas a través de dos tipos distintos de receptores: los receptores Trk, con distintas especificidades de unión, y el receptor  $p75^{\text{NTR}}$ , común a todas ellas. Este último, al carecer de actividad catalítica, necesita de diferentes interactores para la transducción de señales al interior celular. En un estudio de búsqueda de nuevos interactores del receptor  $p75^{\text{NTR}}$  con el fin de clarificar sus mecanismos de acción, se identificó a Ciclofilina B (CypB). Las ciclofilinas, inicialmente descritas por su capacidad de unir el inmunosupresor Ciclosporina A (CsA), son pequeñas peptidil-prolil isomerasas, cuyas funciones biológicas no están del todo esclarecidas; pero que están implicadas en múltiples funciones relacionadas con el correcto plegamiento y función de diversas proteínas.

Esta interacción, que no ha sido descrita previamente, es el motivo de este estudio. Tras ser confirmada a nivel físico, comprobamos que está modulada tanto por la unión de CsA a CypB, como por la interacción de neurotrofinas con  $p75^{\text{NTR}}$ . Además, este fenómeno es dependiente de contexto celular.

Nuestros datos muestran que CsA presenta un efecto negativo sobre la transducción de señales de  $p75^{\text{NTR}}$  en respuesta a neurotrofinas, inhibiendo la fosforilación, internalización, y transducción de señales del receptor TrkA en respuesta a NGF, en un proceso en el que son necesarios CypB y  $p75^{\text{NTR}}$ . Esta observación fue confirmada tanto en células PC12 como en cultivos de neuronas primarias. Dicha acción, además, es específica de ciclofilinas, puesto que no se pudo reproducir utilizando FK506, otra droga inmunosupresora que comparte mecanismos de acción con CsA; y no implica la inhibición de calcineurina, mecanismo clásico de acción de las inmunofilinas. Por otro lado, el tratamiento con CsA provocó un potente efecto negativo sobre el proceso de mielinización periférica, reduciendo drásticamente el número de internodos mielinizados, así como retrasando el grado de maduración de los mismos. Nuevamente, esta respuesta es específica de ciclofilinas e independiente de calcineurina, y además, está ejercida a través de las células de Schwann. Además, se pudo comprobar que CsA es capaz de modular los efectos que tienen el receptor  $p75^{\text{NTR}}$  sobre la migración de las células de Schwann. De este modo, en presencia de dicha droga se pudo eliminar el efecto modulador negativo que presenta BDNF sobre su capacidad migratoria.

Finalmente, pudimos constatar que CsA afecta a la formación de dímeros del receptor  $p75^{\text{NTR}}$ , cuya presencia en membrana es esencial para la transducción de señales en respuesta a neurotrofinas, lo que puede ejercer un vínculo clave entre la actividad de CypB y la señalización neurotrófica de  $p75^{\text{NTR}}$ . Esta descripción presenta un mecanismo novedoso para modular la actividad de  $p75^{\text{NTR}}$ , pudiendo ser un elemento clave en la respuesta neurotrófica.



## ***Abstract.***

Neurotrophins are growth factors that play a critical role in the development and maintenance of the nervous system. They are involved in differentiation or cell death/survival decisions, as well as in more complex phenomena as the control of myelination or cell migration. Neurotrophins activate two different types of cell surface receptors: the Trk family of tyrosine kinase receptors, with binding specificity for particular neurotrophins, and p75<sup>NTR</sup>, able to bind all neurotrophins. The lack of catalytic activity of the p75<sup>NTR</sup> receptor implies that the signaling of this receptor is carried out by its ability to bind to different proteins, resulting in a wide variety of actions. Trying to find new unknown interactors for p75<sup>NTR</sup>, we found Cyclophilin B (CypB). Cyclophilins are small peptidyl-prolyl-isomerases, most known for binding the immunosuppressant drug Cyclosporin A (CsA). The biological functions of cyclophilins are not fully understood so far, but they have been implicated in many aspects mostly related to protein folding and chaperone activity.

We confirmed the physical interaction in several cell types, and we also established that it is modulated by CsA or by neurotrophin binding to p75<sup>NTR</sup>. Also, we found that the degree of interaction is depending on the cellular context.

Our results show that CsA is a negative regulator of p75<sup>NTR</sup> neurotrophin signaling, abrogating its ability to cooperate in TrkA phosphorylation, internalization and signaling, in a CypB and p75<sup>NTR</sup> dependent-way. These experiments were performed in model cell lines, as PC12, but also in primary neuronal cultures. CsA effects are specific of cyclophilins, since it cannot be reproduced using FK506, the other classic immunosuppressor that blocks FKBP. Furthermore, calcineurin inhibition is not involved, implying other different mechanisms of cyclophilins. On the other hand, CsA treatment has a severe negative effect over peripheral myelination, impairing the number of myelinated fibers and slowing down the maturation of myelin internodes in a calcineurin-independent, Schwann cell-dependent fashion. In addition, CsA also blocks the actions of BDNF and p75<sup>NTR</sup> over Schwann Cells migration.

Finally, we demonstrate that p75<sup>NTR</sup> disulphide dimers are impaired in the presence of CsA. Since this dimerization has been proved essential in neurotrophic signaling through this receptor, we propose that it constitutes the link between CsA effects and p75<sup>NTR</sup> inhibition. This finding could be a new step that helps unraveling the neurotrophin signaling mechanisms and constitute a novel way to modulate p75<sup>NTR</sup> signaling.



# *Índice*



## **Abreviaturas**

---

5

## **Introducción**

---

9

### 1. Las neurotrofinas

11

#### 1.1. Neurotrofinas y sus receptores

##### 1.1.1. Los receptores Trk y sus rutas de señalización

###### 1.1.1.1. Ruta Ras-MAPK

###### 1.1.1.2. Ruta Rap-MAPK

###### 1.1.1.3. Ruta PI3K-Akt

###### 1.1.1.4. Ruta PLC $\gamma$

###### 1.1.1.5. Isoformas de los receptores Trk

##### 1.1.2. El receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>

###### 1.1.2.1. Interactores de p75<sup>NTR</sup>

###### 1.1.2.1.1. p75<sup>NTR</sup> como modulador de la señalización por receptores Trk

### 2. Papeles fisiológicos de la señalización neurotrófica por p75<sup>NTR</sup>

20

#### 2.1. Mielinización en el SNP

##### 2.1.1. La envuelta de mielina

##### 2.1.2. Regulación de la mielinización en el SNP

###### 2.1.2.1. El proceso de formación de mielina

###### 2.1.2.2. Papeles de p75<sup>NTR</sup> y las neurotrofinas en la formación de mielina periférica

#### 2.2. Migración de las SCs

#### 2.3. Otras funciones de p75<sup>NTR</sup> en el Sistema Nervioso

#### 2.4. Roles de p75<sup>NTR</sup> fuera del Sistema Nervioso

### 3. Las inmunofilinas

26

#### 3.1. Inmunofilinas e inmunosupresión

#### 3.2. Clasificación de las inmunofilinas

##### 3.2.1. Ciclofilinas

##### 3.2.2. FKBP

##### 3.2.3. Otras inmunofilinas

#### 3.3. Rol fisiológico de las inmunofilinas

## **Objetivos**

---

31

## **Materiales y métodos**

---

35

1.	Tratamientos	37
2.	Medios de cultivo y tampones	37
3.	Anticuerpos	38
4.	Cultivos celulares	40
4.1.	Líneas celulares	
4.2.	Cultivos primarios	
4.2.1.	Neuronas de ganglio raquídeo (DRGNs)	
4.2.2.	Células de Schwann (SCs)	
4.2.3.	Cocultivos mielinizantes de DRGNs con SC	
4.2.4.	Neuronas de ganglio superior cervical (SCGNs)	
5.	Procedimientos	44
5.1.	Análisis por Western Blot	
5.2.	Inmunoprecipitaciones	
5.3.	GST-Pull Down	
5.4.	Tinciones inmunocitoquímicas	
5.5.	Transfecciones y silenciamiento de proteínas	
5.6.	Tinción de mielina por Negro Sudán	
5.7.	Inyecciones en nervio ciático de ratón in vivo	
5.8.	Ensayos en cámaras compartimentalizadas Campenot	
5.9.	Ensayos de cierre de herida y trans migración en cámaras de Boyden	
5.10.	Ensayos de dimerización y marcaje de membrana	
6.	Análisis de datos y procedimientos estadísticos	52
7.	Animales de experimentación y consideraciones éticas	52

## **Resultados** **54**

---

1.	Interacción física entre el receptor p75 <sup>NTR</sup> y Ciclofilina B	57
1.1.	CypB interacciona con p75 <sup>NTR</sup>	
1.2.	La interacción entre p75 <sup>NTR</sup> y CypB está modulada por la unión de CsA	
1.3.	CypB y p75 <sup>NTR</sup> se localizan juntos a nivel subcelular, en función del tipo celular	
2.	Interacción funcional entre el receptor p75 <sup>NTR</sup> y Ciclofilina B	64
2.1.	Acciones del bloqueo de CypB mediante CsA en la interacción p75 <sup>NTR</sup> -Trk	66
2.1.1.	El tratamiento con CsA reduce la internalización de receptores en respuesta a neurotrofinas	



2.1.2.	CsA reduce la activación del receptor TrkA en respuesta a NGF	
2.1.3.	Los efectos de CsA sobre la activación de TrkA son independientes de calcineurina	
2.1.4.	CypB es necesaria para las acciones de CsA sobre la señalización NGF-TrkA	
2.1.5.	p75 <sup>NTR</sup> también es necesario en la acción inhibitoria de CsA sobre la activación de TrkA	
2.2.	El bloqueo de CypB inhibe respuestas de p75 <sup>NTR</sup> independientes de Trk	77
2.2.1.	El bloqueo de CypB inhibe la mielinización periférica	
2.2.1.1.	CsA es un potente inhibidor del proceso de mielinización periférica	
2.2.1.2.	CsA retrasa la maduración de los internodos de mielina en el SNP	
2.2.1.3.	Las acciones de CsA sobre la mielina periférica son calcineurina-independientes	
2.2.1.4.	Los efectos de CsA sobre la mielinización periférica están mediados por las SCs	
2.2.1.5.	CsA disminuye la mielinización in vivo durante el desarrollo del nervio ciático	
2.2.2.	CsA es capaz de bloquear la migración de las SCs mediada por p75 <sup>NTR</sup>	
3.	El tratamiento con CsA reduce la dimerización del receptor p75 <sup>NTR</sup>	88

## **Discusión** **91**

---

1.	CypB interacciona de manera física con p75 <sup>NTR</sup>	93
2.	CypB interfiere en las funciones de p75 <sup>NTR</sup>	97
2.1.	El bloqueo de CypB reduce la actividad de la ruta de señalización NGF-TrkA-p75 <sup>NTR</sup>	
2.2.	CsA como modulador de la señalización de p75 <sup>NTR</sup> Trk-independiente	
2.2.1.	CsA es un potente regulador negativo de la mielinización periférica	
2.2.2.	CsA bloquea los efectos sobre migración celular mediados por p75 <sup>NTR</sup>	
3.	CsA disminuye la dimerización del receptor p75 <sup>NTR</sup>	103
4.	Implicaciones fisiopatológicas y clínicas de la interacción CypB-p75 <sup>NTR</sup>	106

## **Conclusiones** **108**

---

## **Bibliografía** **112**

---

## **Anexos** **127**

---



# *Abreviaturas*



<b>aa:</b> Aminoácido.	<b>GST:</b> Glutation S-Transferasa.
<b>AMPc:</b> Adenosina monofosfato cíclico.	<b>h:</b> horas.
<b>AraC:</b> Citosina β-D-arabino-furanósido.	<b>HRP:</b> Peroxidasa de rábano.
<b>ATP:</b> Adenosina 5' trifosfato.	<b>IAA:</b> Iodoacetamida.
<b>APP:</b> Precursor de la Proteína Amiloide.	<b>IB:</b> Inmunoblot.
<b>BCA:</b> Ácido bicinchonínico.	<b>IF:</b> Inmunofluorescencia.
<b>BDNF:</b> Factor neurotrófico derivado de cerebro.	<b>Ig:</b> Inmunoglobulina.
<b>BPE:</b> Extracto de glándula pituitaria bovina.	<b>IgG:</b> Inmunoglobulina de tipo G.
<b>BSA:</b> Albúmina de suero bovino.	<b>IP:</b> Inmunoprecipitación.
<b>cDNA:</b> ADN complementario o copia.	<b>IPTG:</b> Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
<b>CREB:</b> Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico.	<b>JNK:</b> <i>Jun n-Terminal Kinases</i> .
<b>CsA:</b> Ciclosporina A.	<b>KDa:</b> Kilodalton.
<b>Cyp:</b> Ciclofilina.	<b>LTD:</b> Depresión a largo plazo.
<b>DAPI:</b> 4',6-Diamidino-2-fenilindol.	<b>LTP:</b> Potenciación a largo plazo.
<b>DMEM:</b> Medio Eagle modificado por Dulbeco.	<b>MAPK:</b> <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> .
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido.	<b>MAG:</b> Glicoproteína asociada a mielina.
<b>DO:</b> Densidad óptica.	<b>MBP:</b> Proteína básica de mielina.
<b>DRG:</b> Ganglio raquídeo.	<b>MEM:</b> <i>Minimum Essential Medium</i> .
<b>DTT:</b> Dithiothreitol.	<b>min:</b> minutos.
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetracético.	<b>m-TOR:</b> <i>mammalian Target of Rapamycin</i> .
<b>ERK:</b> Quinasas reguladas por señal extracelular.	<b>NCAM:</b> Molécula de adhesión celular neural.
<b>FBS-HI:</b> Suero fetal bovino inactivado por calor.	<b>NFAT:</b> Factor Nuclear de células T activadas.
<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos.	<b>NGF:</b> Factor de crecimiento nervioso.
<b>FKBP:</b> Proteína de unión a FK.	<b>NRG1:</b> Neuregulina 1.
<b>GEF:</b> Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.	<b>nt:</b> nucleótidos.
<b>GFP:</b> Proteína verde fluorescente.	<b>NT-3:</b> Neurotrofina 3.
<b>GGF:</b> Factor de crecimiento glial.	<b>NT-4/5:</b> Neurotrofina 4/5.
	<b>p75<sup>NTR</sup>:</b> Receptor de neurotrofinas p75.

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida.

**PBS:** Tampón Fosfato Salino.

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.

**PLC:** fosfolipasa C.

**PPI:** Peptidil-prolil isomerasa.

**RIPA:** *RadioImmunoprecipitation assay*.

**RT:** Temperatura ambiente.

**s:** segundos.

**SC:** célula de Schwann.

**SCG:** Ganglio cervical superior.

**SDS:** Dodecilo sulfato sódico.

**shRNA:** ARN pequeño en horquilla.

**siRNA:** ARN interferente pequeño.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico.

**TBS:** Tampón Tris Salino.

**TGFβ:** Factor de crecimiento transformante β.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**TRAF:** Factores asociados al receptor de TNF.

**Trk:** *Tropomyosin Related Kinase*.

**WB:** Western Blot.

# *Introducción*





El sistema nervioso es un elemento fundamental en el desarrollo evolutivo de los animales, encargándose de la percepción e integración de las señales y estímulos, tanto externos como internos; así como de la coordinación de las respuestas del resto de sistemas y órganos. Con su desarrollo y especialización ha ido permitiendo el incremento en la complejidad de las formas de vida. De entre los diversos moduladores del sistema nervioso destacan las neurotrofinas, por su relevancia y amplitud de funciones e implicaciones. Uno de los receptores de neurotrofinas,  $p75^{NTR}$ , se caracteriza por su versatilidad de respuestas, que viene determinada por su capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas diferentes. A pesar de la infinidad de estudios y trabajos que se han realizado sobre la señalización mediada por dicho receptor, existen todavía numerosas incógnitas sobre sus mecanismos de señalización. En una búsqueda de amplio espectro de nuevos interactores con el receptor  $p75^{NTR}$  se identificó, entre otros elementos, a la ciclofilina B (CypB). Dicha interacción, que no había sido caracterizada previamente, constituye el elemento de estudio de la presente tesis doctoral.

### **1. Las neurotrofinas.**

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento implicados en numerosos procesos en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, incluyendo supervivencia y muerte neuronal, proliferación, diferenciación, formación de mielina, crecimiento axonal, liberación de neurotransmisores y plasticidad sináptica. Fueron descubiertas en los años 50 cuando Rita Levi-Montalcini y Stanley Cohen identificaron el factor de crecimiento nervioso o NGF, por sus siglas en

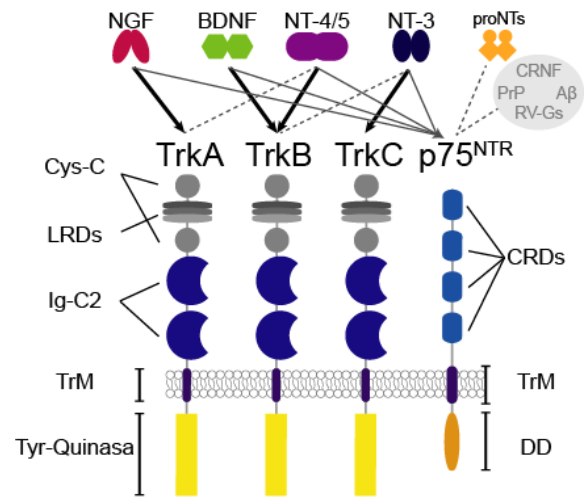
inglés, iniciando la era de los factores de crecimiento y recibiendo por ello el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1986. Su descubrimiento derivó de la búsqueda de los factores responsables del efecto deletéreo que tenía eliminar los tejidos diana sobre la supervivencia de determinadas poblaciones neuronales, lo que constituye la base de la así denominada hipótesis neurotrófica (Cohen et al., 1954, Levi-Montalcini et al., 1954). Las neurotrofinas son responsables de “esculpir” el sistema nervioso, eliminando las células supernumerarias y las conexiones erróneas, y primando la supervivencia de las adecuadas.

La familia comprende cuatro miembros en mamíferos: el ya citado NGF, el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) (Arevalo and Wu, 2006). Aparecen altamente conservadas en vertebrados, con la excepción de NT4/5, que no se ha detectado en aves (Roux and Barker, 2002). En peces se han caracterizado además, NT-6 y NT-7, sin ortólogos conocidos en aves o mamíferos, y que son capaces de señalizar por los mismos receptores que el resto (Reichardt, 2006). Son glicoproteínas sintetizadas en forma de precursores, denominados proneurotrofinas (31-35 KDa), que dan lugar a las formas maduras mediante proteólisis (12-13 KDa). Sus genes comparten muchas características, como la presencia de varios promotores y similitudes en los segmentos genómicos adyacentes. Todas ellas señalizan formando homodímeros unidos de manera no covalente que, generalmente, se expresan de manera limitante durante el desarrollo del organismo. (Chao, 2003, Lu et al., 2005).

Las neurotrofinas no están presentes en invertebrados como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* o la ascidia *Ciona*, habiendo surgido en algún punto anterior a la radiación entre cefalocordados y vertebrados. Sin embargo, si aparecen homólogos de sus receptores a lo largo de la escala evolutiva, como en equinodermos y urocordados (Hibino et al., 2006, Robertson et al., 2006), crustáceos como *Daphnia* (Wilson, 2009) o el caracol *Lymnaea*, con una variante de Trk incluso capaz de unir NT-3 humano (van Kesteren et al., 1998). La participación de las neurotrofinas en aspectos relacionados con la memoria, la modulación sináptica mediante LTP/LDP, la formación de la envuelta de mielina y las interrelaciones neuronales y neurogliales (Reichardt, 2006, Chao, 2003), así como la caracterización de homólogos reconocibles de receptores neurotróficos en moluscos cefalópodos como el pulpo o el calamar, con los sistemas nerviosos más desarrollados de los invertebrados (Jaaro et al., 2001, Moreno et al., 1998), son hechos que avalan su relevancia en la evolución de los animales hacia las formas más complejas.

### 1.1. Neurotrofinas y sus receptores.

El amplio espectro de actividades biológicas ejercidas por las neurotrofinas es en parte resultante de su capacidad de unión a dos tipos diferentes de receptores. Históricamente el primer receptor de neurotrofinas identificado fue el miembro fundador de la familia de los receptores de TNF denominado Receptor de baja afinidad para NGF (LNGFR) o, como es más conocido,  $p75^{NTR}$  (por su tamaño en kDa en humanos). Dicho receptor es capaz de unirse con similar



**Figura I-1: Receptores de neurotrofinas.** Las neurotrofinas señalizan como dímeros, uniéndose a los receptores Trk y  $p75^{NTR}$ . Se muestran las distintas posibilidades de unión y las estructuras de los receptores. Cys-C: agrupaciones de cisteínas. LRD: dominio rico en leucinas. CRD: dominio rico en cisteínas. Ig-C2: dominio tipo inmunoglobulina C2. TrM: dominio transmembrana. DD: dominio de muerte. (Adaptado de Arevalo et al, 2006).

afinidad a todas las neurotrofinas. Por otro lado, las neurotrofinas también se unen a la familia de receptores Trk (*Tropomyosin Related Kinase*), comúnmente considerados sus receptores de alta afinidad. Esta familia comprende tres miembros en mamíferos, que presentan afinidades diferenciales: NGF se une a TrkA, BDNF y NT-4/5 a TrkB y NT-3 a TrkC. Existe cierto grado de promiscuidad, pudiendo unirse NT-3 a los receptores TrkA y TrkB cuando estos presentan un inserto en su dominio extracelular (Arevalo and Wu, 2006, Reichardt, 2006, Barbacid, 1994).

Además, antes de su maduración las proneurotrofinas se pueden unir con alta afinidad a  $p75^{NTR}$ , en un complejo en el que está implicado como correceptor un miembro de la familia de proteínas con dominio VPS10 denominado sortilina, señalizando preferentemente hacia muerte celular (Nykjaer et al., 2005). Esto añade incluso un grado más de complejidad a la señalización neurotrófica, lo que hace todavía más

relevante el estudio de sus rutas de señalización, sus mecanismos de acción y su relación con sus diferentes clases de receptores y correceptores.

### 1.1.1. Los receptores Trk y sus rutas de señalización.

Los receptores Trk son receptores tirosina-quinasa canónicos, con un tamaño total en torno a 140-145 KDa. Presentan un dominio extracelular compuesto por tres motivos ricos en leucina, flanqueados por dos agrupaciones de cisteínas y seguidos de dos dominios tipo inmunoglobulina C2 (Ig-C2). La estequiometría de unión entre neurotrofinas y receptores Trk ha sido establecida como 2:2, de manera que un dímero de neurotrofinas maduras se une a dos moléculas de su receptor correspondiente a través del dominio Ig-C2. Aunque se ha considerado generalmente esta unión como de “alta afinidad”, en realidad este proceso está modulado por la presencia del receptor p75<sup>NTR</sup> y por distintas modificaciones estructurales de los receptores, así como supeditado a la presencia de un ratio correcto de receptores.

Contienen un único dominio transmembrana y una región intracelular donde se encuentra el dominio quinasa. La dimerización de los receptores Trk posibilita la fosforilación en *trans* de distintas tirosinas (Y) del dominio intracelular, como es típico en los receptores tirosina quinasa, que van a actuar de sitios de anclaje para proteínas adaptadoras y efectoras que permiten la respuesta específica a las neurotrofinas. En los receptores Trk de vertebrados aparecen diez tirosinas altamente conservadas. Destacan las tirosinas Y490 e Y785 (numeración que viene determinada

por sus posiciones en la secuencia de TrkA de humano) como principales elementos de anclaje, así como las tirosinas Y670, Y674 y Y675, presentes en el bucle de autorregulación del dominio tirosina quinasa. Las rutas de señalización de los receptores Trk han sido ampliamente estudiadas (Arevalo and Wu, 2006, Reichardt, 2006, Roux and Barker, 2002), mayoritariamente utilizando la línea celular PC12, proveniente de un feocromocitoma adrenal de rata (Greene and Tischler, 1976). Estas células responden a NGF y son el principal modelo de estudio de neuronas simpáticas, aunque, sin embargo, difieren de las neuronas en algunos aspectos (Arevalo and Wu, 2006).

#### 1.1.1.1. Ruta Ras- MAPK.

Al tratar células PC12 con NGF se produce una rápida inducción de la pequeña enzima GTPasa Ras. Esto ocurre asociado a la fosforilación en Y490, que permite el ensamblaje secuencial de Shc y Grb2, lo que activa el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) denominado SOS (*son of sevenless*). Éste facilita el intercambio de GDP por GTP en Ras, activándolo. Ras desencadena, vía Raf-1 y B-Raf, la cascada de activación de las quinasas ERK/MAPK. Esta estimulación es transitoria, y está asociada a un bucle de retroalimentación negativo, de modo que la activación de MAPK promueve la fosforilación de SOS y por tanto su desacople de Grb2. Por otro lado, neurofibromina, una proteína activadora de la actividad GTPasa (GAP), es capaz de inhibir la activación de Ras en neuronas en desarrollo, aunque se sigue estudiando si su actividad está modulada por neurotrofinas (Vogel et al., 2000). La cascada de Ras deriva en señalización y en

regulaciones transcripcionales implicadas en supervivencia neuronal y diferenciación. Así, la activación de Ras en PC12 promueve la aparición de neuritas (Arevalo and Wu, 2006).

### 1.1.1.2. Ruta Rap-MAPK.

Además de la activación transitoria de la ruta MAPK, las neurotrofinas producen una segunda oleada de activación de una manera más prolongada en el tiempo. Esta vía implica los adaptadores CrkII/CrkL, que activan a C3G, otra proteína con actividad GEF. De esta forma, C3G activa la GTPasa Rap1 que, vía B-Raf, estimula una activación prolongada de la ruta MAPK. En este proceso es esencial la internalización del receptor Trk en endosomas (Wu et al., 2001). No está del todo establecido cómo se produce la señalización entre Trk y CrkII/CrkL, aunque uno de los modelos propuestos señala al adaptador FRS2 (sustrato 2 del receptor de fibroblastos), puesto que se une al residuo Y490 de TrkA *in vitro* (Kao et al., 2001). Sin embargo, ratones con mutaciones en Y490 mantienen la habilidad para inducir la respuesta MAPK a largo plazo, por lo que deben existir mecanismos independientes o compensatorios a la fosforilación en Y490 (Postigo et al., 2002). Otro modelo propone la participación de la proteína ARMS/Kidins220, que se fosforila en respuesta a neurotrofinas, permanece activa por largos períodos e interacciona con los receptores Trk a través de sus regiones transmembrana (Iglesias et al., 2000, Kao et al., 2001). Además, se ha demostrado que ARMS/Kidins220 interacciona con CrkL y C3G, y que dicha interacción se puede modular por NGF (Arevalo and Wu, 2006).

La fosforilación prolongada de las MAPK da lugar a la activación de múltiples efectores, como son la quinasa S6 ribosomal P90 (RSK) y MSK1. Estas quinasas fosforilan el factor de transcripción CREB, que regula la expresión de genes esenciales en la supervivencia y diferenciación neuronal (Finkbeiner et al., 1997). La expresión de CREB, a su vez, está regulada por BDNF, lo que genera un bucle retroalimentado que potencia sus acciones neurotróficas (Arevalo and Wu, 2006, Roux and Barker, 2002).

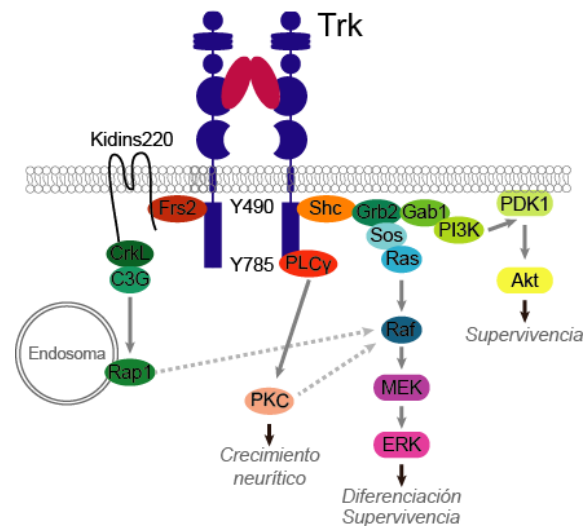
### 1.1.1.3. Ruta PI3K-Akt.

Como ya se ha mencionado, la activación de Trk hace que se asocie con el adaptador Shc, que a su vez interacciona con Grb2. Este último también es capaz de asociarse con el factor Gab1 (*Grb-associated binder-1*), que activa PI3K (Holgado-Madruga et al., 1997). La fosforilación lipídica que genera PI3K recluta a la membrana la serin/treonin quinasa PDK1 (quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol) y a su sustrato, Akt. La forma fosforilada de Akt es responsable de modular varios efectores implicados en supervivencia. Por ejemplo, Akt es capaz de fosforilar Bad (posibilitando nuevas fosforilaciones adicionales por otras quinasas, y previniendo así sus efectos apoptóticos), Caspasa 9 o miembros de la familia Forkhead. Por otro lado, Akt se encarga de fosforilar el inhibidor IκB, marcándolo para degradación y activando así la ruta de supervivencia de NFκB. Además de ser esencial en la supervivencia de muchas poblaciones neuronales en el desarrollo, la ruta PI3K-Akt también media en otros efectos, como el crecimiento y la ramificación axonal o el incremento en el calibre del axón en neuronas

sensoriales. En estos casos, el mecanismo responsable es una inactivación local de la quinasa de glucógeno sintasa GSK-3 $\beta$  vía fosforilación por Akt, lo que promueve la asociación de microtúbulos (Arevalo and Wu, 2006, Roux and Barker, 2002). Adicionalmente, en neuronas se observa también la activación de PI3K por una ruta dependiente de Ras, mediante interacción directa entre ambas (Roux and Barker, 2002).

#### 1.1.1.4. Ruta PLC $\gamma$ .

La fosforilación en Y785 del receptor Trk promueve el reclutamiento y consecuente activación de PLC $\gamma$  (Obermeier et al., 1994). Dicha enzima corta el fosfolípido PIP $_2$  generando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP $_3$ ). Ambos componentes, junto con una liberación de Ca $^{2+}$  de compartimentos intracelulares mediada por IP $_3$ , son causa de la activación de distintas isoformas de la proteína-quinasa C (PKC). Por ejemplo, el DAG induce la activación de PKC $\delta$ , que está implicada en crecimiento neurítico (Corbit et al., 1999)). Las PKC también van a producir la activación de rutas MAPK, vía Raf. La activación de PLC $\gamma$  por parte de las neurotrofinas ha sido implicada en diversos aspectos, como el quimiotropismo de los conos de crecimiento o en la potenciación de la sensibilidad de respuesta de diversos canales iónicos, como VR1. Por otro lado, ratones con mutaciones en el sitio de anclaje para PLC $\gamma$  muestran defectos en la LTP en el hipocampo mediada por BDNF y TrkB, lo que indicaría su participación en el proceso (Minichiello et al., 1999). Curiosamente, en la posición 785 del único ortólogo de Trk presente en *Amphioxus* hay una glutamina, en lugar de una tirosina. Esto explica el hecho de que las



**Figura I-2: Rutas de señalización de los receptores Trk.** La unión de neurotrofinas desencadena la dimerización y fosforilación de Trk, lo que posibilita el acoplamiento de diversas proteínas efectoras. Dichas proteínas se acoplan a las diferentes tirosinas fosforiladas, indicadas en la figura. En cursiva se señalan las principales implicaciones celulares de la activación de cada ruta (Adaptado de Arevalo *et al*, 2006).

neurotrofinas de mamíferos sean capaces de activar rutas de diferenciación y supervivencia en *Amphioxus*, pero son incapaces de hacer lo mismo con la ruta de PLC $\gamma$ . Así, esta ruta parece ser una adaptación posterior al resto en términos evolutivos (Benito-Gutierrez et al., 2006, Benito-Gutierrez et al., 2005).

#### 1.1.1.5. Isoformas de los receptores Trk.

Se han detectado diferentes isoformas para los tres tipos de receptores Trk. Destacan sobre todo isoformas de los receptores TrkC y, especialmente, TrkB que carecen del dominio tirosina quinasa, y que se expresan a elevados niveles en los organismos maduros. Concretamente, las isoformas truncadas de TrkB denominadas T1 y T2 (con dominios intracelulares de 23 y 21 aa, respectivamente) se expresan durante el desarrollo postnatal (Klein et al., 1990, Middlemas et al., 1991), y son las formas predominantes de TrkB en el cerebro adulto (Fryer et al., 1996) y células no neurales. Estas isoformas son consideradas



moduladores negativos, actuando como secuestradores de BDNF, al internalizarlo y eliminar su biodisponibilidad (Bibel and Barde, 2000). Sin embargo, también son capaces de señalizar independientemente en determinadas circunstancias, interactuando con elementos como el inhibidor de disociación de GDP de Rho 1 (RhoGDI-1) (Ohira et al., 2005).

### 1.1.2. El receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup>.

El receptor p75<sup>NTR</sup> fue clonado en 1986 (Chao et al., 1986, Radeke et al., 1987). Es una proteína transmembrana de tipo I de 399 aa que consta, en su dominio extracelular, de cuatro motivos ricos en cisteína (CRD) colocados en tándem y cargados negativamente. En el dominio intracelular se encuentran una región flexible yuxtamembrana y un dominio de muerte, compuesto de dos conjuntos perpendiculares de tres hélices que componen una estructura globular. En cualquier caso, dicho dominio carece de actividad catalítica conocida (Arevalo and Wu, 2006). Su peso molecular aparente, 75 KDa en humanos, está determinado por modificaciones postraduccionales de tipo N y O-glicosilación y palmitoilización.

Sus características estructurales le incluyen en la superfamilia de receptores de TNF (TNFR), de la cual es miembro fundador (denominado TNFRSF16). Esta familia incluye, entre otros, a Fas o CD40. Sin embargo, p75<sup>NTR</sup> difiere en múltiples aspectos del resto de elementos de dicha familia. Los miembros de la superfamilia TNFR se caracterizan por asociarse en respuesta a ligando a través de sus dominios de muerte (DD), de tipo I; mientras que p75<sup>NTR</sup>, con un DD de tipo II, no tiene este comportamiento. Además, los ligandos

de la familia de TNFR son típicamente homotrímeros de proteínas sintetizadas como proteínas transmembrana de tipo II, que pueden ser procesadas a proteínas solubles (como TNF) o permanecer anclados a la membrana (como TRAIL), a diferencia de los ligandos de p75<sup>NTR</sup>, que son homodímeros solubles. Dichas diferencias otorgan a la señalización vía p75<sup>NTR</sup> cualidades bastante diferentes a la de otros miembros de la familia TNFR (Underwood and Coulson, 2008).

La resolución de la estructura cristalina de p75<sup>NTR</sup> unido a NGF muestra un inesperado ratio de unión de dos moléculas de NGF por una de receptor. La unión a un monómero de p75<sup>NTR</sup> produce un cambio alostérico en el homodímero de NGF que modifica la conformación del putativo sitio de unión a una segunda molécula de receptor. El cristal, además, permitiría explicar la unión de todas las neurotrofinas por igual a p75<sup>NTR</sup>, puesto que la unión se produce en una región con alto grado de conservación en las cuatro neurotrofinas (He and Garcia, 2004).

Aparte de las neurotrofinas clásicas, existe otro elemento aislado de invertebrados, el factor neurotrófico rico en cisteínas o CRNF, que es capaz de unirse a p75<sup>NTR</sup> con afinidad en el orden nanomolar, pudiendo ser el elemento prototípico de una familia de ligandos de p75<sup>NTR</sup> todavía desconocida (Fainzilber et al., 1996). Además, p75<sup>NTR</sup> se puede unir a glicoproteínas de la envuelta del virus de la rabia (Tuffereau et al., 1998), sirviendo de posible mecanismo de entrada al virus. Otros ligandos atípicos con capacidad de unión, también en el orden nanomolar son el péptido Aβ de APP y el fragmento neurotóxico de príon PrP, produciendo ambos apoptosis mediada

por  $p75^{NTR}$  (Dechant and Barde, 2002). Finalmente, aunque de manera indirecta, también son capaces de interactuar con este receptor ciertos elementos inhibidores derivados de mielina, de los que se hablará más adelante.

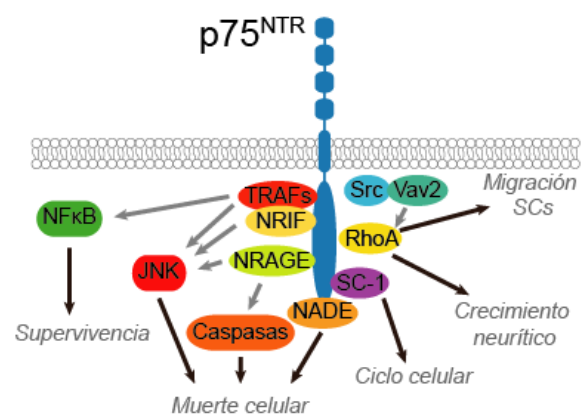
Se han localizado en *Xenopus laevis* dos genes con similitudes estructurales a  $p75^{NTR}$ : NRH (*Neurotrophin Receptor Homolog*) 1a y 1b, mientras que en mamíferos se ha encontrado un gen relacionado que se ha denominado NRH2. Este gen codifica para una proteína muy similar a  $p75^{NTR}$  en los dominios transmembrana y citoplasmático pero con el dominio extracelular truncado, faltando los dominios CRD, por lo que no podría unirse a neurotrofinas (Kanning et al., 2003). Este receptor también es capaz de interactuar con TrkA y modular su unión a NGF (Murray et al., 2004) y se ha propuesto como el posible responsable de ciertos mecanismos compensatorios observados en ausencia de  $p75^{NTR}$  (Barker, 2004).

Transcurridos más de 35 años desde su descubrimiento, poco se sabe todavía sobre los mecanismos de señalización de  $p75^{NTR}$ . Recientemente ha sido descrito que  $p75^{NTR}$  forma dímeros unidos por puentes disulfuro en ausencia de neurotrofinas, a través de la cisteína 257 presente en el dominio transmembrana de dicho receptor. Esta cisteína está altamente conservada evolutivamente y cuando se elimina  $p75^{NTR}$  pierde la capacidad de responder a neurotrofinas, sin afectar a otras rutas de señalización (Vilar et al., 2009a). Dicho mecanismo implicaría que la dimerización por puentes disulfuro es esencial para la transmisión de cambios conformacionales del receptor a los dominios intracelulares, que ocurren

tras la unión de neurotrofinas. Además, la formación de dímeros de  $p75^{NTR}$  permanentes mediante *crosslinking* genera una activación constitutiva e independiente de la unión de neurotrofinas, indicando que la alteración conformacional de los dímeros es la responsable de la transducción de señales (Vilar et al., 2009b).

### 1.1.2.1. Interactores de $p75^{NTR}$ .

Al carecer de actividad catalítica, la transducción de señales mediada por  $p75^{NTR}$  requiere de otras proteínas interactoras, ya estén asociadas constitutivamente o sean reclutadas como consecuencia de la unión a las neurotrofinas (Arevalo and Wu, 2006, Hasegawa et al., 2004, Reichardt, 2006, Roux and Barker, 2002). Por ejemplo, la unión de neurotrofinas a  $p75^{NTR}$  produce la hidrólisis de esfingomielina y la liberación de ceramidas, así como inducción de la vía de NF $\kappa$ B, implicando numerosos interactores citoplasmáticos diferentes como responsables de estas vías de señalización (Dobrowsky and Carter, 1998).



**Figura I-3: Principales vías de señalización de  $p75^{NTR}$ .** La señalización intracelular de  $p75^{NTR}$  está mediada por su interacción con diversas proteínas efectoras a través de su dominio intracelular. Se resumen los principales efectores, así como las implicaciones celulares de su señalización. (Adaptado de Arevalo et al, 2006).

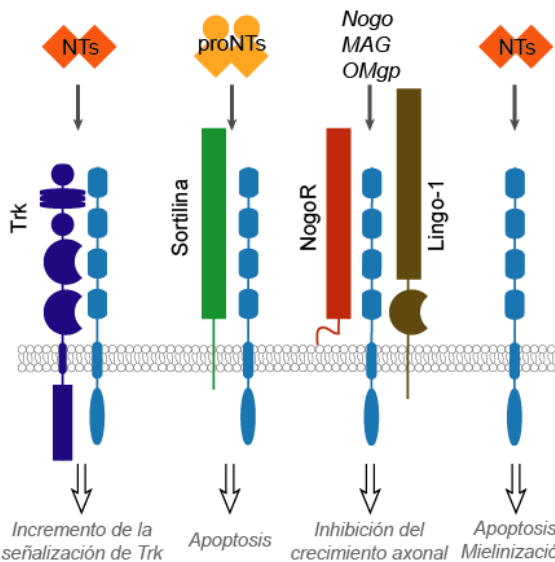
El dominio intracelular de  $p75^{NTR}$  contiene regiones con elevada conservación, destacando los dominios yuxtamembrana e intramembrana, que indica un rol importante en las interacciones proteína-proteína (Bothwell, 1995). La mayoría de las proteínas de la superfamilia TNFR son capaces de unir los factores asociados a TNFR o TRAFs, que enlazan con rutas de señalización tales como las vías de JNK, NF $\kappa$ B o Src. Aunque  $p75^{NTR}$  no presenta una secuencia consenso de unión a TRAFs se ha reportado su capacidad de unir TRAF4 (Krajewska et al., 1998) y TRAF6, siendo este último necesario para la activación de JNK y NF $\kappa$ B mediada por  $p75^{NTR}$  (Khursigara et al., 1999). Otro interacto descubierto por ensayos de doble híbrido es NRIF (*Neurotrophic Receptor Interacting Factor*), que se asocia con TRAF6 para activar JNK, y que además induce muerte celular vía translocación al núcleo (Casademunt et al., 1999, Gentry et al., 2004). También interacta con  $p75^{NTR}$  el denominado NRAGE (*Neurotrophic Receptor interacting MAGE homologue*), en este caso a través de la región yuxtamembrana, y que va a inducir apoptosis vía NGF en ausencia de TrkA (Salehi et al., 2000). NADE (*p75<sup>NTR</sup> Associated Death Executor*) es un elemento que interactúa con  $p75^{NTR}$  a través de su DD, unión que aparece cuando  $p75^{NTR}$  es activado por NGF pero no por otras neurotrofinas (Mukai et al., 2000). El factor SC-1 es una proteína que interacta con  $p75^{NTR}$ , que normalmente se encuentra en el citoplasma pero que, al unirse NGF a  $p75^{NTR}$  en lugar de a TrkA, se transloca al núcleo donde actúa como represor transcripcional para inhibir el ciclo celular (Chittka et al., 2004, Chittka and Chao, 1999).

Otro consorte de  $p75^{NTR}$  es sortilina, un receptor transmembrana de tipo I miembro de la familia VPS10 que está implicada en procesos de clasificación de proteínas y tráfico vesicular. La interacción entre ambos está mediada por proneurotrofinas, que se unen a sortilina por el prodominio y a  $p75^{NTR}$  por su región típica de unión. Las rutas mediadas por esta interacción, que no están del todo dilucidadas, podrían implicar fragmentos intracelulares (ICDs) de ambos componentes, producidas por  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasas; así como el desplazamiento de otros interactores de  $p75^{NTR}$  como los Trks (Barker, 2004, Nykjaer et al., 2005).

RhoGDI es otra proteína capaz de interactuar directamente con el dominio de muerte de  $p75^{NTR}$ . En ausencia de neurotrofinas,  $p75^{NTR}$  se une a RhoGDI y activa a la GTPasa RhoA, inhibiendo el crecimiento neurítico. La unión de neurotrofinas elimina esta interacción, inhibiendo por tanto RhoA y estimulando el crecimiento axonal (Luo, 2000, Yamashita et al., 1999). Esta modulación de RhoA independiente de la unión de neurotrofinas es la base de actuación que media la acción del receptor de Nogo (NgR), una proteína anclada por GPI a la membrana que carece de dominio intracelular. El complejo NgR/ $p75^{NTR}$  media la inhibición del crecimiento axonal producida por los denominados MDGIs (inhibidores del crecimiento derivados de mielina), tales como Nogo, MAG o la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp) (Wang et al., 2002, Wong et al., 2002). Además, LINGO-1, otra proteína transmembrana específica del sistema nervioso, es capaz de unirse al complejo NgR/ $p75^{NTR}$ , formando parte de su mecanismo de



señalización (Barker, 2004, Mi et al., 2004). Por otra parte, NgR también es capaz de interactuar con TROY, otro miembro de la superfamilia de TNFR, que podría ejercer como sustituto funcional de  $p75^{\text{NTR}}$  cuando este no está presente (Park et al., 2005, Shao et al., 2005).



**Figura 1-4: Distintos módulos de señalización del receptor  $p75^{\text{NTR}}$ .**  $p75^{\text{NTR}}$ , a través de su interacción con diferentes proteínas transmembrana (que ejercen o no de correceptores), se puede unir a diferentes ligandos, desencadenando múltiples respuestas según contexto. (Adaptado de Barker et al., 2004).

#### 1.1.2.1.1. $p75^{\text{NTR}}$ como modulador de la señalización por receptores Trk.

A pesar de la descripción inicial de  $p75^{\text{NTR}}$  como receptor de baja afinidad, la capacidad de unión de neurotrofinas del mismo es muy similar a la de los receptores Trk, presentando una constante de disociación ( $K_d$ ) en torno a 1-10 nM (Barker, 2004). En presencia de ambos receptores, sin embargo, es cuando se produce la unión de alta afinidad (con una  $K_d$  de  $10^{-11}$  M) (Zaccaro et al., 2001). Por ello, inicialmente, se consideró a  $p75^{\text{NTR}}$  como un mero correceptor de los receptores Trk. Sin embargo, esta visión se ha ido demostrado como demasiado simplista, y se

considera que la presencia de ambos receptores posibilita la aparición de “sitios de alta afinidad”. El patrón de expresión de ambos tipos de receptores prácticamente solapa, y en algunos casos, como en DRGNs, todas las neuronas que expresan TrkA van a expresar también  $p75^{\text{NTR}}$ . *In vitro*, neuronas que expresan ambos receptores responden a menores concentraciones de NGF que aquellas que expresan sólo TrkA, y en ratones deficientes (KO) en  $p75^{\text{NTR}}$  se requiere una mayor concentración de NGF para la supervivencia neuronal (Lee et al., 1994). Además, cuando los dos receptores se expresan juntos, la tasa de asociación de NGF con TrkA se incrementa (Bothwell, 1995, Wehrman et al., 2007). En línea con estos datos, una versión mutante de NGF capaz de activar TrkA pero incapaz de unirse a  $p75^{\text{NTR}}$  muestra una actividad biológica mucho menor (Horton et al., 1997).

La visión más aceptada para explicar la unión de alta afinidad es la formación de un complejo heteromérico entre  $p75^{\text{NTR}}$  y un dímero de TrkA. (Bibel et al., 1999, Huber and Chao, 1995, Lad et al., 2003). Esta comunicación física podría generar cambios alostéricos en ambos receptores, incrementándose la unión de NGF a TrkA de forma independiente de su unión a  $p75^{\text{NTR}}$  (Hasegawa et al., 2004). Otra posibilidad es que la unión de NGF a  $p75^{\text{NTR}}$  genere incrementos de la concentración local de la neurotrofina, aumentando así su eficiencia de unión a TrkA (Wehrman et al., 2007). También se ha postulado la opción de que señales derivadas de la unión de ligando a  $p75^{\text{NTR}}$  modifique la capacidad de señalización de TrkA debido a su fosforilación (MacPhee and Barker, 1997). En el caso de TrkB,

su interacción con  $p75^{NTR}$  es a través de los dominios extracelular e intracelular, siendo aparentemente innecesario el dominio intramembrana. Además, esta interacción es sensible a la fosforilación de TrkB y dependiente de la actividad tirosina quinasa (Bibel et al., 1999).

Aparte de incrementar la afinidad de NGF por TrkA,  $p75^{NTR}$  reduce la capacidad de NT-3 para activar TrkA, por lo que regula tanto la especificidad como la sensibilidad de respuesta de Trk a las neurotrofinas (Barker and Shooter, 1994, Verdi et al., 1994). En el caso de TrkB, la coexpresión de  $p75^{NTR}$  conlleva una reducción en su activación en respuesta tanto a BDNF como a NT-4/5 (Vesa et al., 2000b, Bibel et al., 1999). Esta interacción funcional, así como sus implicaciones fisiológicas durante el desarrollo, ha sido demostrada *in vivo* esencialmente en neuronas simpáticas. En el inicio del desarrollo del sistema nervioso, en ausencia de  $p75^{NTR}$ , el NT-3 local promueve la supervivencia de las neuronas, al menos en parte, a través de TrkA. Una vez que el axón alcanza su objetivo, recibe NGF secretado por los tejidos diana y se activa TrkA, que es transportado retrógradamente, lo que produce una regulación positiva de  $p75^{NTR}$ , que al expresarse hace que las células dejen de responder a NT-3 (Reichardt, 2006, Arevalo and Wu, 2006, Chao, 2003).

La interacción entre Trk y  $p75^{NTR}$  no es unidireccional, puesto que la activación de Trk también modula la señalización de  $p75^{NTR}$ . Por ejemplo, en células que expresan ambos receptores las señales pro-supervivencia Trk dependientes prevalecen sobre las señales pro-apoptóticas mediadas por  $p75^{NTR}$  (Bamji et al., 1998).

## **2. Papeles fisiológicos de la señalización neurotrófica por $p75^{NTR}$ .**

### **2.1. Mielinización en el SNP.**

#### **2.1.1. La envuelta de mielina.**

La mielina es una especialización de la membrana celular característica del sistema nervioso cuya función principal es la de aislar los axones, permitiendo así una conducción del impulso nervioso mejorada: más rápida y eficaz. Ejerce, básicamente, la misma función que la cubierta plástica en un cable eléctrico, impidiendo la difusión de la corriente eléctrica al exterior. Además, la mielina es esencial para la supervivencia y el soporte trófico de los axones a los que rodea. Los axones que se mielinizan son los que presentan un diámetro superior a  $1\ \mu\text{m}$ , y se van a encontrar completamente recubiertos de mielina, salvo en los denominados nodos de Ranvier. En estas zonas se concentran los canales iónicos, lo que da lugar a la denominada conducción saltatoria. La región situada entre un nodo de Ranvier y el siguiente se denomina internodo.

Las células encargadas de mielinizar los axones son las células de Schwann (SC) en el SNP y los oligodendrocitos en SNC. A pesar de su origen celular diferente, ambos tipos de mielina son prácticamente idénticos en su función, aunque presentan algunas diferencias a nivel morfológico y molecular, siendo la principal que, a diferencia del SNC donde cada oligodendrocito forma múltiples internodos con varios axones, en el SNP cada SC establece relación con un solo axón y da lugar a un solo internodo.

La envuelta de mielina presenta una composición específica, con un alto contenido de proteínas frente a lípidos en comparación con otras membranas celulares (Garbay et al., 2000). Es esencial en esta ultraestructura la lámina basal de las SCs, que forma el soporte sobre el cual se producirá la acumulación consecutiva de vueltas de la membrana de las células mielinizantes. Para su síntesis es esencial la vitamina C o ácido ascórbico.

La vaina de mielina presenta dos formas estructurales diferenciadas, la mielina compacta y la no compacta, con una distribución de proteínas diferenciada. La mielina compacta forma la mayor parte del internodo y dentro de su composición proteica destaca  $P_0$ , que llega a representar hasta el 60% del peso seco de la mielina, y es la principal responsable de su compactación. La proteína básica de mielina o MBP, de carácter citoplasmático, es otro componente fundamental de estas regiones compactas, formando la mayor parte de la línea densa mayor (Arroyo and Scherer, 2000). Otra proteína destacada es PMP22, proteína hidrofóbica de membrana poco abundante y cuya función se desconoce. Si se sabe, sin embargo, que su cantidad es crítica en la mielina periférica, como se pone de manifiesto con el hecho de que las principales neuropatías hereditarias están causadas por repeticiones, deleciones o mutaciones de su gen (Arroyo and Scherer, 2000).

La mielina no compacta aparece presente en los paranodos (regiones laterales de las vainas de mielina) y en las incisuras de Schmidt-Lanterman (interrupciones con forma de embudo presentes a lo largo de la mielina compacta). En estas áreas destaca la presencia de la glicoproteína asociada a

mielina o MAG, que se encuentra también en grandes cantidades en las superficies apicales/adaxonales (Arroyo and Scherer, 2000). Está implicada en la señalización glía-axón y en la regulación del crecimiento axonal (Quarles, 2007). Otras proteínas típicas de las regiones no compactas son la E-cadherina, responsable de la formación de uniones adherentes de tipo desmosoma, y Cx32, que forma uniones tipo gap.

### **2.1.2. Regulación de la mielinización en el SNP.**

#### *2.1.2.1 El proceso de formación de mielina.*

El proceso de mielinización surge del equilibrio entre dos programas reguladores opuestos: uno negativo que impide la mielinización antes de tiempo y que permiten la proliferación y migración de las SCs, y otro posterior positivo que va a permitir que se dé el proceso de mielinización como tal. Además, en procesos de daño que implican pérdida de mielina, así como en distintas neuropatías desmielinizantes se produce nuevamente una activación de los factores reguladores negativos (Jessen and Mirsky, 2008).

A nivel transcripcional, el principal elemento positivo en el proceso de formación de mielina, considerado el elemento clave, es el factor Krox-20 (o Egr-2), que regula directamente la expresión de genes esenciales en la mielina, como los de  $P_0$ , MBP, MAG, PMP-22, Conexina 32 o HMG-CoA reductasa. Otros reguladores positivos son Oct-6 (POU3F1) y Brn2 (POU3F2) (Svaren and Meijer, 2008) y Sox10 (Jessen and Mirsky, 2005, Jessen and Mirsky, 2008, Svaren and Meijer, 2008).

Por el contrario, el principal regulador negativo de la mielinización es c-Jun. Su expresión es constitutiva en SCs inmaduras, pero se suprime al

activarse Krox-20. En su presencia no ocurre el proceso de mielinización y, además, se induce rápidamente después de procesos de daño en nervios, desencadenando la desdiferenciación de las SCs (Jessen and Mirsky, 2008, Parkinson et al., 2008). Sox-2 presenta una regulación paralela a c-Jun, y hay ciertas evidencias de que éste controla, al menos en parte, su expresión. Sin embargo, se desconoce cómo interactúan ambos factores (Jessen and Mirsky, 2008, Parkinson et al., 2008). Otros de los represores de la mielinización conocidos son Sox-2, Notch y Pax-3 (Jessen and Mirsky, 2008).

El proceso de mielinización representa uno de los máximos exponentes de interacción célula-célula, y está altamente mediado por señales de ambos tipos celulares participantes. Durante la maduración de los nervios las SCs provenientes de la cresta neural van a migrar a lo largo de los haces de axones desnudos, proliferando y segregándolos hasta que gradualmente se establece una relación 1:1 entre SCs y axones, mientras que las SCs van a ir alargándose lateralmente a lo largo del axón a la vez que sintetizan la lámina basal en su superficie abaxonal. Un factor esencial en que se desencadene este proceso es el contacto con el axón (Friede, 1972) que es esencial para la expresión continuada de los genes de mielina y el mantenimiento del fenotipo mielinizante (Garbay et al., 2000), probablemente a través de la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Jessen and Mirsky, 2008) y la acción de las neuregulinas y sus receptores tirosina quinasa ErbB2 y ErbB3. Concretamente la NRG1, que es esencial en la migración de las células desde la

cresta neural, es también el principal mitógeno de las SCs (Dong et al., 1995, Zanazzi et al., 2001).

Recientemente, se ha descrito como modulador de la formación de mielina periférica al ácido retinoico (RA). En nuestro laboratorio se ha demostrado que RA es un potente regulador de la mielinización periférica, actuando a través de dos mecanismos diferentes. Por un lado, a través del receptor RXR, un exceso de RA produce una inducción de Krox-20, originando una sobreexpresión deletérea de P<sub>0</sub> y MBP; y por otro lado inhibe la expresión de MAG en un mecanismo dependiente del receptor RAR (Latasa et al., 2010).

### *2.1.2.2. Papel de p75<sup>NTR</sup> y las neurotrofinas en la formación de mielina periférica.*

Las neurotrofinas tienen una gran relevancia en la mielinización periférica, aunque difícil de interpretar en algunas circunstancias debido a sus múltiples acciones pleiotrópicas, constituyendo el principal elemento de supervivencia de diferentes tipos neuronales. Tanto neuronas centrales y periféricas como SCs y oligodendrocitos sintetizan y secretan neurotrofinas, y además expresan los receptores para las mismas. En el caso de las DRGNs, aproximadamente un 80% mueren en ausencia de NGF, un 30% en el caso de BDNF y un 70% en ausencia de NT-3 a lo largo del desarrollo (Xiao et al., 2009). En la formación de mielina, se ha demostrado que NGF actúa como un importante regulador positivo actuando a través de la activación de TrkA en las DRGNs dependientes de NGF, constituyendo un requerimiento esencial para que puedan ser mielinizadas por SCs, al tiempo que impiden su mielinización por

oligodendrocitos (Chan et al., 2004). En el caso de NT-3 su papel es menos claro. NT-3 inhibe en gran medida la mielinización periférica tanto en cocultivos mielinizantes *in vitro* como durante el desarrollo del nervio ciático *in vivo* (Chan et al., 2001, Xiao et al., 2009, Cosgaya et al., 2002). Esta inhibición se produce vía TrkC, ya que se conserva en el ratón deficiente para  $p75^{NTR}$ , aunque aún se desconoce si el elemento responsable es la neurona o la SC.

Las acciones de BDNF sobre la mielinización son complejas y, dependiendo del tipo celular, pueden ser positivas o negativas. Así, mientras que en las DRGNs TrkB+ (dependientes de BDNF), esta neurotrofina parece tener un efecto negativo sobre el proceso de mielinización debido a la activación de TrkB (Xiao et al., 2009), en las DRGNs TrkA+ (dependientes de NGF) BDNF va a producir un incremento en la producción de mielina (Chan et al., 2001), mediante un proceso dependiente de  $p75^{NTR}$  (Cosgaya et al., 2002). Un posible punto de discrepancia parecería encontrarse en el tipo celular sobre el que ejerce su acción positiva el BDNF. Los resultados de Xiao et al. (Xiao et al., 2009) parecen sugerir que las neuronas constituyen las células diana sobre las que actúa el BDNF. Pero el hecho de que el BDNF es secretado por las propias neuronas y, tras ser transportado anterógradamente desde los somas hasta el axón, captado por las SCs (Ng et al., 2007), junto con el hecho de que el BDNF también ha sido implicado en la regulación de la polaridad de las SCs, proceso muy importante en el inicio de la mielinización, promoviendo la asociación entre  $p75^{NTR}$  y la proteína de polaridad Par-3 en las uniones axón-glía (Chan et al., 2006), parecería

indicar que  $p75^{NTR}$  glial es el responsable del efecto positivo del BDNF y que los efectos observados en neuronas se deban a la capacidad de las mismas de incorporar BDNF exógeno para ser transportado anterógradamente y, posteriormente, secretarlo en los axones donde ejercerían su acción sobre las SCs.

### 2.2. Migración de las SCs.

Las neurotrofinas y sus receptores también van a participar en procesos anteriores a la formación de mielina durante el desarrollo regulando la proliferación y diferenciación glial, así como la migración de las células a lo largo de los nervios, proceso que va a contribuir de forma destacada a correcta innervación de los órganos periféricos por parte de los axones (Morris et al., 1999). Es por ello que la regulación espaciotemporal de la síntesis y secreción de las distintas neurotrofinas y sus receptores va a ser un elemento clave en todo este proceso. Además, cuando ocurre un daño en los procesos nerviosos, durante el proceso de neurorreparación se recapitula el proceso normal de desarrollo, y las neurotrofinas vuelven a intervenir, inhibiendo la mielinización y promoviendo nuevamente los procesos migratorios.

Aunque probablemente un elemento esencial en la regulación de la migración de las SCs es la ruta de las neuregulinas y sus receptores ErbB (Mahanthappa et al., 1996), el receptor  $p75^{NTR}$ , que se expresa tanto a lo largo de los axones como en las SCs, también es un elemento esencial en esta relación dinámica. Estudios realizados con el modelo de ratón deficiente en  $p75^{NTR}$  indican que, además de presentar un menor crecimiento y



arborización de los axones de DRGNs, los nervios de estos animales presentaron un menor número de SCs. Estudios *in vitro* confirmaron que, efectivamente, las SCs carentes de p75<sup>NTR</sup> presentan un importante retardo en su migración a lo largo de los nervios (Bentley and Lee, 2000b).

Ya desde hace casi 20 años, se sabe que el NGF presenta un efecto positivo sobre la migración de las SCs (Anton et al., 1994). Puesto que estas células carecen de TrkA y puede ser bloqueado inhibiendo la unión de NGF a p75<sup>NTR</sup>, los efectos de NGF implican la participación de este receptor. Estudios *in vitro* demuestran, a su vez, que BDNF es un potente inhibidor de la migración de las SCs mediante un mecanismo dependiente de p75<sup>NTR</sup>. Este efecto se inicia a través de la activación de la quinasa Src, que a su vez va a activar RhoA a través del GEF Vav2 (Yamauchi et al., 2004). A pesar de que no se conocen los mecanismos exactos por los que se enlazan estas rutas, el hecho de que TRAF6 sea capaz de interactuar con Src (Wong et al., 1999) lo convierte en un candidato adecuado para ejercer de nexo en este caso. Un caso especial es NT3, cuya presencia estimula la migración de las SCs en unas etapas en el desarrollo en las que inhibe la formación de mielina. En este caso, el mediador de los efectos de NT-3 sobre la migración de las SCs es TrkC, puesto que se mantienen en ausencia de p75<sup>NTR</sup> y se ve bloqueado al añadir el inhibidor de Trk K252a, al igual que ocurre con la regulación de la formación de mielina por esta neurotrofina. En contraste con lo observado para BDNF y sus efectos positivos sobre la migración glial, esta ruta de señalización va a implicar a las Rho GTPasas Cdc42 y Rac1, además de la activación de JNK

(Yamauchi et al., 2005, Yamauchi et al., 2003). A pesar de que Rac1, Cdc42 y RhoA tienen acciones mayoritariamente redundantes, en este caso su activación va a producir acciones contrapuestas que van a controlar la migración de las SCs, no siendo un caso aislado que funcionen de maneras antagónicas (Schmidt and Hall, 2002b).

### 2.3. Otras funciones de p75<sup>NTR</sup> en el SN.

Además de los papeles ya descritos, está ampliamente establecido que una de las principales funciones del receptor p75<sup>NTR</sup> es la regulación de procesos de muerte celular (Bibel and Barde, 2000, Nykjaer, 2005). Mientras que p75<sup>NTR</sup> en presencia de Trk va a colaborar en desencadenar vías de supervivencia celular en respuesta a neurotrofinas, en su ausencia va a señalar principalmente hacia muerte celular. La mera sobreexpresión del dominio intracelular de p75<sup>NTR</sup> es capaz de causar la muerte masiva de neuronas durante el desarrollo (Majdan et al., 1997), probablemente por autoasociación a través de los DD. Sin embargo, también se ha observado que la unión de NGF a p75<sup>NTR</sup> puede inducir apoptosis durante el desarrollo de la retina en aves (Frade et al., 1996) y ratones (Frade and Barde, 1999), o que la adición de BDNF es capaz de matar neuronas simpáticas activando p75<sup>NTR</sup> tanto en cultivo como durante el desarrollo (Bamji et al., 1998). Como ya se ha mencionado, las proneurotrofinas son también capaces de interactuar con p75<sup>NTR</sup>, utilizando sortilina a modo de correceptor. Dicha unión también va a inducir rutas proapoptóticas, como se observa tanto en el caso del proNGF (Beattie et al., 2002) como con proBDNF (Pang et al., 2004). Por lo tanto, p75<sup>NTR</sup> y las neurotrofinas van a ejercer un importante papel como reguladores de las

decisiones vida/muerte de múltiples células en el SN, en función del contexto espacio-temporal y de los diferentes elementos interactores.

Por otro lado, p75<sup>NTR</sup> es un importante regulador del crecimiento axonal. Como ya se ha mencionado, p75<sup>NTR</sup> modula la actividad de RhoA. Dicha enzima es una pequeña GTPasa que regula el estado de polimerización de la actina de modo que cuando está activa aumenta la rigidez del citoesqueleto de actina inhibiendo el crecimiento neurítico (Schmidt and Hall, 2002a). Cuando, en respuesta a la unión de neurotrofinas, p75<sup>NTR</sup> inhibe RhoA, se favorece el crecimiento axonal (Yamashita et al., 1999) así como el incremento de tamaño de los filopodios en los conos de crecimiento de diferentes neuronas (Gehler et al., 2004). A nivel fisiológico, los axones corticotalámicos expresan elevados niveles de p75<sup>NTR</sup> y presentan complejos conos de crecimiento. Sin embargo, en ausencia del receptor, dichos conos son mucho menores (McQuillen et al., 2002). Además, la ausencia del receptor de neurotrofinas durante el desarrollo va a provocar importantes deficiencias en la innervación y crecimiento axonal (Bentley and Lee, 2000a).

Destaca también el papel de p75<sup>NTR</sup> en la liberación de neurotransmisores y la transmisión sináptica. Por ejemplo, la unión de neurotrofinas a p75<sup>NTR</sup> estimula la liberación de dopamina, en combinación con Trk, en neuronas mesencefálicas (Blochl and Sirrenberg, 1996) o regula la liberación de neurotrofinas a través de secreción regulada (Kruttgen et al., 1998). En el SNC, mientras que BDNF vía TrkB va a estimular la respuesta LTP en el hipocampo (Poo, 2001), la falta de p75<sup>NTR</sup> conlleva deficiencias en LTD

(Rosch et al., 2005). Además, la activación de p75<sup>NTR</sup> mediante proBDNF también va a estimular la respuesta LTD (Woo et al., 2005).

### 2.4. Roles de p75<sup>NTR</sup> fuera del SN.

Además de sus múltiples funciones en el sistema nervioso, las neurotrofinas y sus receptores, tanto los distintos Trk como p75<sup>NTR</sup>, se expresan y poseen un amplio espectro de funciones en otros sistemas y tejidos, participando en la diferenciación de células cardíacas y vasculares, o en el mantenimiento y supervivencia de células inmunes (Sariola, 2001, Tessarollo, 1998).

El receptor p75<sup>NTR</sup> se expresa de manera ubicua durante el desarrollo y en el organismo adulto y, aunque sus niveles de expresión más elevados se encuentran en SNC y SNP, puede ser detectado en la gran mayoría de tejidos y tipos celulares no neurales. Por ejemplo, la expresión de p75<sup>NTR</sup> es esencial para la diferenciación de las células madres del mesénquima (Mikami et al., 2011), en el control del ciclo de crecimiento de los folículos capilares (Botchkarev et al., 2004), o en la morfogénesis del riñón (Sariola et al., 1991). Además, resulta esencial en el desarrollo del sistema circulatorio, pues la eliminación por completo de p75<sup>NTR</sup> en un modelo animal provoca un fenotipo con graves defectos vasculares (von Schack et al., 2001). La relevancia de neurotrofinas y sus receptores en el Sistema Inmune también ha sido ampliamente estudiada, llegando incluso a ser consideradas inmunotrofinas por diversos autores (Fainzilber and Carter, 2002, Serafeim and Gordon, 2001), destacando el papel de NGF como factor proliferativo en linfocitos.

A nivel fisiopatológico, p75<sup>NTR</sup> también está implicado en la progresión tumoral de los melanomas, pudiendo ser un marcador de células madre tumorales (Boiko et al., 2010). Además, estudios *in vitro* han demostrado que el NGF puede regular la proliferación y la migración de este tipo de células tumorales, regulando su invasividad (Truzzi et al., 2008).

### **3. Las inmunofilinas.**

Las inmunofilinas son proteínas altamente conservadas y ubicuas, que fueron descritas inicialmente como los elementos de unión de las principales drogas inmunosupresoras. Se dividen en dos familias: las ciclofilinas, denominadas así por su capacidad de unión a Ciclosporina A (CsA), y las proteínas de unión a FK506, o FKBP, que se unen a FK506 y a rapamicina. La CsA es un undecapéptido neutro y cíclico, producido por el hongo del suelo *Tolypocladium inflatum*, aislado y descrito por primera vez en 1976 (Borel et al., 1976). Destaca por su potente efecto antilinfocítico. El FK506 o Tacrolimus es un macrólido, aislado de *Streptomyces tsubakensis*, y que presenta efectos inmunosupresores análogos a los de CsA, aunque ejerce su acción a menores dosis (Goto et al., 1987, Kino et al., 1987). Existe un tercer grupo menos conocido de inmunofilinas, las denominadas PPIasas similares a parvulina, que se unen a juglona o 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Hennig et al., 1998).

Todas las inmunofilinas se caracterizan por presentar actividad enzimática rotamasa o peptidil-prolil isomerasa (PPIasa) (Galat, 1993), lo que indicaría su posible participación en el correcto plegamiento y tráfico de proteínas. Resulta

curioso, sin embargo, que aun presentando la misma actividad catalítica, ciclofilinas y FKBP no presenten ningún tipo de similitudes estructurales ni a nivel de secuencia. Sin embargo, en ambos grupos el agente inmunosupresor compite por unión con el dominio PPIasa (Barik, 2006), por lo que la unión de las drogas inmunosupresoras va a inhibir también esta actividad enzimática.

### **3.1. Inmunofilinas e inmunosupresión.**

El efecto inmunosupresor de las inmunofilinas no está mediado solamente por la unión de los agentes inmunosupresores, sino que requiere de la formación de complejos ternarios con otros elementos. Ya desde su descubrimiento, datos como el antagonismo recíproco que se observa entre rapamicina y FK506, muy similar a la competencia entre drogas que se unen a receptores acoplados a proteína G, parecían indicarlo. Por otro lado, la capacidad de los inmunosupresores de actuar a concentraciones tan bajas, que no ocupan más que un mínimo porcentaje de los niveles de inmunofilinas (la abundancia de las ciclofilinas está en el rango  $\mu\text{M}$ , mientras que los inmunosupresores tienen eficacias en torno al pM o nM, (Ferreira and Orry, 2012)), indicaría que su mecanismo de actuación implica una ganancia de función más que una inhibición de actividad enzimática (Snyder and Sabatini, 1995).

Mediante cromatografía de afinidad se identificó como interactor con los complejos inmunosupresor-inmunofilina a la fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina conocida como PP2B o calcineurina (Friedman and Weissman, 1991, Liu et al., 1991). Esta fosfatasa es un heterodímero integrado por una subunidad



catalítica y otra reguladora (calcineurina A y B, respectivamente). Cuando CsA o FK506 se unen a sus respectivas inmunofilinas, se induce la formación de un complejo ternario con calcineurina, inhibiendo su actividad fosfatasa. De este modo, se impide la defosforilación de los factores de transcripción nucleares asociados a células T (NFAT), requisito necesario para su translocación al núcleo y por lo que, entre otros efectos, no van a poder activar la expresión del gen de interleucina 2 (IL-2), fundamental en la diferenciación y multiplicación de linfocitos y, por tanto, en la respuesta inmune (Rao et al., 1997, Schreiber, 1991, Snyder and Sabatini, 1995). La inmunosupresor ha sido ampliamente usada en sus aplicaciones clínicas desde el descubrimiento de CsA y FK506.

## 3.2. Clasificación de las inmunofilinas.

### 3.2.1. Ciclofilinas.

Las ciclofilinas están presentes en toda clase de organismos, apareciendo en bacterias, levaduras, plantas, insectos y mamíferos. Su estructura y actividad enzimática están altamente conservadas a lo largo de la evolución (Schiene-Fischer et al., 2013). Todas comparten un único dominio común de 109 aa, denominado CLD (*Cyclophilin Like Domain*), que constituye el sitio de unión de CsA (Barik, 2006). Este dominio se complementa con dominios específicos para cada miembro de la familia, que van a determinar distintas especializaciones y localizaciones subcelulares. En mamíferos hay más de 20 parálogos de ciclofilinas, siendo las principales CypA, B, C, D, E, 40 y NK; mientras que en *Drosophilla* se encuentran al menos 9 y en *Arabidopsis* hay 29

ciclofilinas putativas (Wang and Heitman, 2005, Galat, 1993).

El miembro fundador de la familia, CypA, fue descrito inicialmente como el receptor intracelular de CsA en 1984 (Handschumacher et al., 1984), mismo año en el que, de manera independiente, se describió su actividad peptidil-prolil isomerasa (Fischer et al., 1984). Es la ciclofilina más abundante, y tiene un tamaño aproximado en humanos de 18 KDa. Su distribución celular es fundamentalmente citosólica y es considerado el principal efector de los efectos inmunosupresores de CsA, puesto que en el modelo de deficiencia de CypA se produce resistencia a la inmunosupresión mediada por la misma (Colgan et al., 2005).

CypB, de 23 KDa, fue inicialmente clonada de manera independiente como un factor neurotrófico para células embrionarias de médula espinal (Caroni et al., 1991) y por homología de secuencia con CypA (Price et al., 1991). También es muy abundante, pero a diferencia de CypA posee un motivo de retención en retículo endoplasmático (AIAKE) en su extremo C-terminal (Bose et al., 1994, Price et al., 1994). Es considerada ortólogo

	Estructura	Tamaño (KDa)	Localización
CypA	CLD	18	c
CypB	PS-CLD-ER	23	re, n, s
CypC	PS-CLD	22	c, s
CypD	M-CLD	19	m
CypE	CLD-RB	33	n
Cyp40	CLD-TPR-TPR-TPR	40	c

**Figura 1-5: Principales ciclofilinas de mamíferos.** Estructura, tamaño y localización subcelular de las ciclofilinas mayoritarias de los mamíferos. PS: péptido señal. M: señal de localización mitocondrial. ER: señal de retención en retículo endoplasmático. RB: motivo de unión a ARN. TPR: repetición de tetratricopéptico. c: citoplasma, re: retículo, m: mitocondria, n: núcleo, s: secretado (Adaptado de Barik et al., 2006).

de la ciclofilina de *Drosophila* NinaA, la única otro ciclofilina que posee secuencias de retención en retículo endoplasmático. Sin embargo, los modelos de deficiencia para ambas proteínas presentan fenotipos completamente diferentes (Ferreira and Orry, 2012).

Además de las principales, existen muchas más ciclofilinas de menor abundancia. Por ejemplo, CypD está presente en mitocondrias y es un componente del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial con un papel destacado en la apoptosis inducida por calcio y especies reactivas de oxígeno. Además, está implicada en rutas de muerte celular independientes de caspasa, y podría estar implicada en aprendizaje y memoria (Mouri et al., 2010). Por otra parte, Cyp40 es un componente de la forma inactiva del receptor de glucocorticoides y puede formar un complejo dimérico con la proteína de choque térmico Hsp90 al cual no afecta la presencia de CsA (Barik, 2006, Wang and Heitman, 2005).

### 3.2.2. FKBP.

Dadas las características funcionales de FK506, tan similares a las de CsA, en el momento de su descubrimiento se asumió que ambas moléculas compartían receptor. Sin embargo, pronto se descubrió que FK506 presentaba afinidad nula por las ciclofilinas, utilizando su propia familia de receptores, que se denominaron proteínas de unión a FK506 o FKBP (Siekierka et al., 1989a, Siekierka et al., 1989b, Harding et al., 1989). Esta familia está constituida por múltiples proteínas de bajo peso molecular y distintas localizaciones subcelulares. Se han descrito 15 miembros en humanos, que se denominan en función de sus

pesos moleculares y se dividen en cuatro grupos en función de su localización (citoplasmáticas, nucleares o de ruta de secreción) o la presencia de repeticiones de tetratricopeptido (TPR). La más pequeña, considerada el miembro arquetípico, es FKBP12, y constituye el principal elemento de unión a FK506 y rapamicina mediando en la inmunosupresión (Galat, 1993, Gerard et al., 2011).

Una de las principales diferencias entre FKBP y ciclofilinas es la capacidad de las primeras de interactuar, como ya se ha comentado, con rapamicina. El complejo rapamicina-FKBP no va a inhibir a calcineurina, sino que inhibe a mTOR (de *mammalian Target of Rapamycin*), una proteína quinasa esencial en diversas rutas (Inoki et al., 2005). Dicha interacción también va a desencadenar una respuesta de inmunosupresión aunque por un mecanismo totalmente distinto.

Las FKBP van a participar en multitud de fenómenos biológicos. Por ejemplo, FKBP12 está implicada en fenómenos como la señalización por calcio, interactuando con el receptor de rianodina (Jayaraman et al., 1992) o neurodegeneración, donde ha sido asociada a la proteína tau de Alzheimer (Sugata et al., 2009)) al dominio intracelular de APP (Liu et al., 2006). De hecho, se observa un marcado incremento en sus niveles en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Avramut and Achim, 2002). FKBP51 y FKBP52 han sido descritas como interactoras en la señalización por receptores esteroideos, y los ratones deficientes para las mismas presentan importantes deficiencias reproductivas (Cheung-Flynn et al., 2005). FKBP52, además, presenta un papel protector

frente al estrés oxidativo en los ovarios (Hirota et al., 2010).

### 3.2.3. Otras inmunofilinas

Existe una tercer grupo menos conocido de inmunofilinas, las denominadas PPIasas similares a parvulina o parvulinas, con capacidad de unión a juglona o 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (Hennig et al., 1998) y, cuyo único miembro conocido en mamíferos, Pin1, tiene como elemento diferenciador el que su capacidad prolil-isomerasa depende de que la prolina esté precedida por una serina o una treonina fosforilada. Esta peculiaridad hace que Pin1 juegue un papel fundamental en distintos procesos tales como envejecimiento, cáncer o neurodegeneración (Lee et al., 2011).

Recientemente, además, ha sido descubierta una nueva familia de inmunofilinas quiméricas que contienen dominios tanto de unión a CsA como a FK506, denominadas FCBPs (*FK506 and CsA Binding Proteins*) (Adams et al., 2005). Esta nueva familia presenta la misma actividad enzimática y las mismas características y funciones biológicas que el resto de inmunofilinas, lo cual complica aún más la ya existente redundancia que se da en esta familia, y que tanto dificulta los estudios de pérdidas de función.

### 3.3. Rol fisiológico de las ciclofilinas.

A pesar del destacado papel de CsA y FK506 en clínica, dichas drogas no forman parte de la fisiología de organismos superiores de manera natural. Nuevamente sin ser su función fisiológica, numerosos trabajos han demostrado que las ciclofilinas son importantes cofactores en la replicación de determinados virus. De este modo, CypA es esencial en la formación e infectividad de

los viriones del HIV-1, mediante su interacción con la proteína vírica estructural Gag (Braaten and Luban, 2001, Luban et al., 1993). De forma similar, CypB interactúa con la proteína NS5B del HCV, y el tratamiento con CsA es capaz de inhibir la replicación de dicho virus (Watashi et al., 2005, Watashi and Shimotohno, 2007b).

Sin embargo, el hecho de que las inmunofilinas se encuentren de manera ubicua en toda clase de organismos a lo largo de toda la escala evolutiva, desde bacterias a plantas o mamíferos, indica que su función biológica ha de ir más allá de su papel en inmunosupresión. Debido a su actividad enzimática, han sido relacionadas con el control del plegamiento de proteínas, y se han descrito numerosos procesos de este tipo que dependen de las inmunofilinas. Por ejemplo, NinaA (el ortólogo de CypB en *Drosophila*) es crucial en el plegado de varias isoformas de rhodopsina (Stamnes et al., 1991). La actividad peptidil-prolil isomerasa es responsable de la estabilización y aceleración de la transición entre estados *cis-trans* de los enlaces imida de prolinas, proceso esencial en el correcto plegamiento de las proteínas, pero también en el ensamblaje de proteínas con múltiples dominios (Gothel et al., 1996). Además, muchas ciclofilinas presentan actividad de tipo foldasa (Kruse et al., 1995), en muchos casos de manera independiente a la unión de CsA y por tanto de la actividad peptidil-prolil isomerasa, como es el caso de Cyp40 (Freeman et al., 1996).

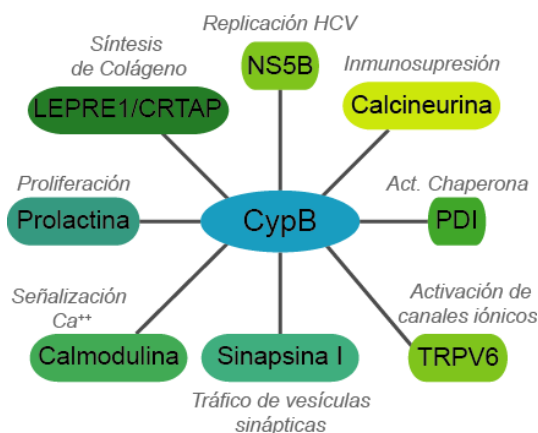
De acuerdo con su implicación en la respuesta inmune, el modelo de ratón deficiente en CypA no presenta problemas de viabilidad, pero sin embargo desarrolla enfermedades alérgicas similares a las producidas por sobreexpresión de IL-

4 (Colgan et al., 2004). CypA es, además, importante para la maduración de receptores oligoméricos de tipo canales iónicos (Helekar et al., 1994) y para la actividad de las proteínas YY1 y Zpr1 (Ansari et al., 2002), y ha sido descrita como mediadora inflamatoria (Kim et al., 2004, Pap, 2005, Sherry et al., 1992).

Mucho más compleja parece la función fisiológica de CypB. Un papel fundamental de CypB viene dado por su interacción con la chaperona PDI (*Protein Disulfide Isomerase*), que cataliza la formación de puentes disulfuro esenciales en la formación de la estructura terciaria de las proteínas. CypB incrementa la actividad de PDI mientras que CsA bloquea por completo su actividad (Horibe et al., 2002). El ratón KO para CypB muestra anomalías en las fibras de colágeno debido a su participación en un complejo proteico con la enzima Prolil-3-Hidroxilasa-1 o LEPRE. Este complejo CypB/P3H1 junto con CRTAP (proteína asociada a cartílago) va a ser esencial en la formación del colágeno, y su disrupción origina la patología denominada osteogénesis imperfecta (Choi et al., 2009). También se ha implicado a CypB y a su actividad

PPIasa en la respuesta celular a prolactina debido a su capacidad de interaccionar con esta hormona, promoviendo su retrotraslocación al núcleo y con ello el crecimiento celular y proliferación. Estos efectos se pierden en ausencia de la actividad PPIasa de CypB (Rycyzyn and Clevenger, 2002). Se ha descrito, además, la interacción entre CypB y el canal iónico TRPV6, siendo un candidato a regular su activación a través de su actividad peptidil-prolil isomerasa (Stumpf et al., 2008).

Más allá de su participación como diana terapéutica en la respuesta inmunitaria, los estudios de niveles de expresión revelan que las inmunofilinas son, de hecho, más abundantes en el sistema nervioso que en el sistema inmune (Dawson et al., 1994, Schreiber, 1991, Steiner et al., 1992). El estudio de su funcionalidad en el sistema nervioso hasta el momento arroja la existencia de efectos contrapuestos,, presentando efectos neuroprotectores o neurotóxicos en función de los estudios y efectos analizados (Sabatini et al., 1997, Snyder and Sabatini, 1995, Lyons et al., 1995). Por un lado, existen numerosos indicios de neurotoxicidad en el uso clínico tanto de CsA como FK506 (Bechstein, 2000, Bartynski et al., 2001) y la inhibición de CyPs con CsA conlleva un incremento en la acumulación de la forma maligna de PrP (Cohen and Taraboulos, 2003). Por otro lado, se ha observado que CsA puede tener un efecto neuroregenerador, especialmente en modelos de isquemia cerebral (Domanska-Janik et al., 2004, Mbye et al., 2009) y tanto CsA como FK506 pueden ejercer acciones neurotróficas en distintos tipos celulares (Steiner et al., 1997)



**Figura I-6: Principales interactores de CypB.** CypB es capaz de interaccionar con numerosas proteínas. Aquí se resumen algunas de las más relevantes, con las posibles implicaciones de dicha interacción en cursiva.

# *Objetivos*



El propósito principal de esta tesis doctoral es el estudio de la **interacción física y funcional** entre el receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup> y la Ciclofilina B. Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

**1.-** Validar la **interacción física** entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, determinando la capacidad de cada elemento de interactuar con el otro en condiciones *in vitro*.

**2.-** Determinar la capacidad de ambos elementos para interactuar en el **contexto celular**.

**3.-** Caracterizar qué efectos tienen sobre dicha interacción los elementos de unión a cada una de estas proteínas (neurotrofinas en el caso de p75<sup>NTR</sup> y CsA en el caso de CypB).

**4.-** Analizar la relevancia de la interacción de CypB sobre los **efectos fisiológicos** de p75<sup>NTR</sup> en respuesta a neurotrofinas, usando para ello los siguientes enfoques:

**4.1.-** Comprobar la implicación de CypB en la acción colaborativa del receptor p75<sup>NTR</sup> sobre la señalización del receptor **TrkA** en respuesta a NGF.

**4.2.-** Estudiar la participación de CypB sobre las funciones de p75<sup>NTR</sup> en el proceso de **mielinización** periférica.

**4.3.-** Investigar si CypB interviene en la modulación vía p75<sup>NTR</sup> de la **migración** de SCs.

**5.-** Estudiar la implicación de CypB en los mecanismos de **activación** y transducción de señales de p75<sup>NTR</sup>.





# *Materiales y métodos*



## **1. Tratamientos.**

- Los factores NGF (purificado de glándula submaxilar de ratón, AbD Serotec), BDNF (recombinante de humano, Regeneron), NT-3 (recombinante humano, Amgen) y FGF (FGF-2 básico, recombinante murino, Peprotech) se utilizaron, a las concentraciones especificadas en cada caso, disueltos en los medios de cultivo, a partir de soluciones concentradas preparadas en agua Milli-Q.

- Los agentes inmunosupresores CsA (aislado de *Tolypocladium inflatum*, Calbiochem) y FK506 (de nombre comercial Tacrolimus, aislado de *Streptomyces tsukubaensis*, Sigma-Aldrich) se prepararon disueltos en etanol, a una concentración de almacenaje de 5 mM. Para su uso final se diluyeron en los medios de cultivo, tratando los controles correspondientes con cantidades equivalentes de etanol diluido en medio de cultivo.

## **2. Medios de cultivo y tampones.**

- Medio de cultivo M1: MEM (Gibco-Invitrogen) con 10% de suero fetal bovino (Gibco-Invitrogen) inactivado por calor durante 30 min a 56°C (FBS-HI), 2% de glucosa y 100 ng/ml de NGF.

- Medio de cultivo E2F: MEM con 1% de suplemento N-2 (Gibco-Invitrogen), 2% de glucosa, 100 ng/ml de NGF y 8 µM de 5-Fluoro-2'-deoxiuridina en combinación con 4 µM de Uridina (ambos de Sigma-Aldrich).

- Medio de proliferación de cocultivos: DMEM/F-12 con 1 mM L-Glutamina, 1% de suplemento N-2, 2% de glucosa y 100 ng/ml de NGF.

- Medio de cultivo definido "Sato": DMEM/F-12 (Gibco-Invitrogen) suplementado con 1 mM L-Glutamina (Gibco-Invitrogen), 100 µg/ml de transferrina bovina (Gibco-Invitrogen), 5 µg/ml de insulina, 10,1 ng/ml de triyodotironina (T3), 0,4 µg/ml de tiroxina (T4), 160 ng/ml de selenio, 38 ng/ml de dexametasona y 60 ng/ml de progesterona (todos procedentes de Sigma-Aldrich) (Meintanis et al., 2001).

- Tampón PBS: 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 136 mM de NaCl y 2,7 mM de KCl.

- Tampón Versene: 18,76 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 136 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl y 0,77 mM de EDTA.

- Tampón RIPA: 50 mM de Tris-HCl, pH 8, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2,5 mM de NaF, 0,5% de deoxicolato sódico (Sigma-Aldrich), 1% de Nonidet P-40 (Roche) y 0,1% de SDS (Sigma-Aldrich). Se añade una pastilla de inhibidor de proteasas cOmplete® (Roche) por cada 50 ml de tampón, justo antes del uso.

- Tampón de carga "Laemmli": 63 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de Glicerol, 2% de SDS, 0,0025% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich); suplementado con 0,1 M de DTT (Sigma-Aldrich) cuando se utiliza en condiciones reductoras. El stock se prepara habitualmente como 6X.

- Tampón de carrera de electroforesis: 25 mM de Tris Base (Sigma-Aldrich) y 192 mM de Glicina (Bio-Rad), pH 8,6-8,8, con 0,1% de SDS.

- Tampón de transferencia de electroforesis: 25 mM de Tris Base y 192 mM de Glicina, pH 8,6-8,8, con un 20% de metanol (Merck).

- Tampón TBS: 20 mM de Tris-HCl, pH 7,6 y 136 mM de NaCl.

- Tampón T-TBS: TBS con 0,05% de Tween-20 (Sigma-Aldrich).

- Solución de bloqueo para WB: 5% de leche de vaca desnatada en polvo (La Asturiana) en T-TBS.

- Solución de anticuerpos primarios para WB: 5% de BSA (Sigma-Aldrich) en T-TBS.

- Tampón de lisis para IP: PBS, pH 7,4, con 1% de Tritón X-100 conteniendo inhibidor de proteasas cOmplete® (una tableta por cada 50 ml).

- Tampón NETN: 20 mM de Tris-HCl, pH 8, 100 mM de NaCl y 1 mM de EDTA, con 1% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y 1% Sarkosyl (N-Laurylsarcosine sodium salt, Sigma-Aldrich), con 1 mM de DTT e inhibidor de proteasas cOmplete® (una tableta por cada 50 ml).

- Tampón PBS-Ca-Mg: PBS, pH 7,4, con 0,9 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

- Tampón ABS (Antibody Blocking Solution): 50 mM de Trizma® Base (Sigma-Aldrich), pH 7,4,

150 mM de NaCl, 1% de BSA, 100 mM L-Lisina (Sigma-Aldrich).

- Tampón MRB (Medium Restricted Buffer) 10X: 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM de NaCl; 100 mM de MgCl y 10 mM de DTT.

### **3. Anticuerpos.**

- Para la detección de p75<sup>NTR</sup> se utilizaron dos anticuerpos diferentes. Para WB se utilizó un anticuerpo policlonal generado en conejo (Upstate) preparado a una dilución de 1:1000. Por otro lado, la visualización en inmunofluorescencias así como la inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal MC192. Dicho anticuerpo se produjo en el laboratorio, a partir de su hibridoma (Chandler et al., 1984). Para ello, se cultivaron las células en suspensión en medio RPMI (Gibco-Invitrogen), suplementado con 10% de FBS-HI, en frascos de cultivo (Falcon). Una vez crecidas, se sustituyó el medio por RPMI sin suero durante 10 días para estimular la secreción del anticuerpo al medio. Posteriormente se recogió el cultivo, se centrifugó y el sobrenadante fue sometido a una precipitación por sulfato amónico saturado, según el método descrito en (Harlow and Lane), seguido de su resuspensión en PBS y posterior diálisis contra PBS en condiciones ácidas (en presencia de 0,1% de ácido acético), quedando una concentración final aproximada de anticuerpo de 0,05 µg/µl, que fue determinada por comparación frente a un patrón realizado con inmunoglobulinas de concentración conocida, separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE y teñidas con Coomassie Brilliant Blue (Bio-

Rad). Las diluciones empleadas fueron 1:100 para IF y 2 µg/ml para IP.

- Para el reconocimiento de CypB se empleó un anticuerpo policlonal de conejo (Abcam), usado a diluciones 1:1000 en WB y 1:250 en IF. En el caso de CypA el anticuerpo utilizado fue un policlonal de conejo (Upstate) a diluciones 1:1000 en WB y 1:250 en IF.

- El estudio del receptor de neurotrofinas TrkA se llevó a cabo con diversos anticuerpos. Para reconocer la forma fosforilada de la proteína se utilizaron los anticuerpos policlonales de conejo Phospho-TrkA (Tyr490) y Phospho-TrkA (Tyr674/675), del PhosphoPlus® TrkA Antibody Kit (Cell Signaling Technology), ambos a una dilución 1:1000. Para el análisis de la proteína total en WB se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo RTA [*rat trkA*, proporcionado por L. Reichardt (Clary et al., 1994)], a una dilución de 1:1000. En IF el anticuerpo de elección fue un monoclonal de ratón anti-Trk (Zymed, Invitrogen Immunodetection), diluido 1:200.

- Para analizar la señalización secundaria de rutas ERK se recurrió a varios anticuerpos: para detectar la forma fosforilada de ERK 1/2 se usó el anticuerpo monoclonal de ratón E-4, (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000 en WB; mientras que para observar la cantidad total de ERK se usaron dos anticuerpos distintos, un policlonal de conejo contra ERK 1/2 (Cell Signaling Technology) a 1:1000, y un policlonal de conejo frente a ERK 2 C-14 (Santa Cruz Biotechnology) a 1:2000.

- En el marcaje de proteínas de mielina se usaron los anticuerpos señalados a continuación. En el caso de MAG fue usado un anticuerpo monoclonal de ratón (Chemicon). Para detectar P<sub>0</sub> se usó un anticuerpo monoclonal de ratón (Astexx). En el reconocimiento de MBP se empleó un anticuerpo policlonal de conejo (Chemicon). En todos los casos se diluyeron 1:500 para IF y 1:1000 para WB.

- Para visualizar axones en IF se empleó un anticuerpo policlonal de conejo contra cadena pesada de Neurofilamento 200 (Sigma-Aldrich), a una dilución de 1:500.

- El anticuerpo de elección para el reconocimiento de NFATc1 fue un monoclonal de ratón (Alexis Biochemicals), diluido 1:1000, que permite distinguir las formas fosforiladas y no fosforiladas en función de su diferente movilidad electroforética. También se utilizaron anticuerpos frente a NFATc2 (suministrado por E. Cano y J.M. Redondo (Cano et al., 2005)) y NFATc3 (M-75 de Santa Cruz Biotechnology), ambos a una dilución 1:1000, aunque no se pudo detectar su expresión en las líneas y tipos celulares utilizados.

- Para la inmunodetección de GST se empleó el anticuerpo policlonal de conejo Z-5 (Santa Cruz Biotechnology), diluido 1:1000.

- Para el reconocimiento de β-actina se recurrió a un anticuerpo monoclonal directamente conjugado con HRP (Sigma-Aldrich), preparado a una dilución 1:10000. En este caso particular, el anticuerpo fue diluido en TBS con 0,1% Tween-20 y 5% de leche en polvo, y todos los

procedimientos (bloqueo, incubación y lavados) fueron realizados a esa misma concentración, en lugar del 0,05% habitual.

#### **4. Cultivos celulares.**

##### **4.1. Líneas celulares.**

- Las células PC12 tienen su origen en un feocromocitoma de rata (Greene and Tischler, 1976). Fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM suplementado con 6% de suero bovino y 6% de suero equino (ambos de Gibco-Invitrogen) en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, en placas Falcon P-100. Para su multiplicación fueron lavadas y levantadas con tampón Versene. Tras ser dispersadas mecánicamente mediante su paso por jeringas de 2 ml acopladas a agujas BD Microlance™ 3 de 20G x 1” para evitar la formación de agregados celulares de gran tamaño, fueron diluidas a la concentración deseada, típicamente 1:5 para el equivalente de una placa P100 a partir de células a confluencia. Para los experimentos de inducción por NGF las células se sembraron en placas Falcon de 24 pocillos directamente a un ≈90% de confluencia, entre 24 y 48 h antes del tratamiento. Previamente al experimento, tras 2 lavados en DMEM suplementado con 0,1% de BSA para eliminar los restos de suero, se mantuvo las células un mínimo de 4 h en el mismo medio, para así reducir todo lo posible las actividades basales de las rutas MAPK debidas al suero.

- Las células MG87 son una sublínea derivada de la línea de fibroblastos de ratón 3T3, transfectadas de manera estable con la isoforma larga de TrkA

(MG87-TrkA), o con vector vacío (MG87) (Regeneron Pharmaceuticals) (Nye et al., 1992). Para la expresión del receptor p75<sup>NTR</sup> se cotransfectó esta línea de manera estable con el vector pBJ5 conteniendo el cDNA de p75<sup>NTR</sup> y con el vector pSV2neo como forma de selección (Vesa et al., 2000a), obteniendo así la línea MG87-TrkA/p75. Para su crecimiento y mantenimiento se empleó DMEM con 10% de suero bovino, en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, en placas Falcon P-100. Para su multiplicación se lavaron con PBS, se levantaron con Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco-Invitrogen) y se diluyeron a la concentración adecuada (habitualmente 1:10 a partir de células a confluencia). De manera similar al procedimiento en células PC12, para los experimentos las células fueron sembradas a un ≈90% de confluencia en placas Falcon de 24 pocillos 24-48 h antes del experimento, lavadas dos veces con DMEM con 0,1% de BSA y deplecionadas de suero un mínimo de 4 h, antes de proceder a los tratamientos correspondientes.

##### **4.2. Cultivos primarios.**

###### **4.2.1. Neuronas de ganglio raquídeo (DRGNs).**

Las DRGNs se obtuvieron de embriones de rata Wistar en día 16 de desarrollo gestacional. Los embriones se aislaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar horizontal y se diseccionaron hasta la exposición de la médula espinal. De la médula aislada se retiraron los ganglios raquídeos, situados por pares a ambos lados de la misma.

Tras la disociación de los ganglios por métodos enzimáticos (45 min a 37°C en tripsina-EDTA 0,25%, Gibco-Invitrogen) y posterior trituración mecánica (mediante su paso por una pipeta Pasteur estrechada por calor), las células se sembraron en placas Falcon de 6 pocillos tratadas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y colágeno (Colágeno Tipo I de cola de rata, Sigma-Aldrich), o con Matrigel™ (BD Bioscience). En ambos casos, la siembra se llevó a cabo con aproximadamente 50000 neuronas por pocillo. Para los experimentos de IF, las células se sembraron sobre cristales cubreobjeto de 25 mm de diámetro (VWR), previamente tratados con los mismos sustratos. La siembra se realizó en la parte central del pocillo, en un volumen de 300 µl de M1, para que los cuerpos neuronales quedasen relegados a la parte central y los axones se extendiesen al resto de la superficie. Al día siguiente de la siembra se añadió 1 ml de E2F, inundando por completo el pocillo. Para la purificación de las neuronas y eliminación de células acompañantes se practicaron 2 ó 3 ciclos alternos de 48-72 h con medio E2F y medio de crecimiento M1, en función del grado de pureza obtenida. El mantenimiento de las células se realizó en medio M1, en incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, cambiando el medio cada 48-72 h.

Las neuronas destinadas a experimentos de inducción con NGF a corto plazo, fueron sembradas en placas Falcon de 24 pocillos, previamente tratadas con Matrigel™, a una concentración aproximada de 100000 células por pocillo. Tras un único ciclo de 72 h con E2F y uno o dos ciclos de recuperación de 48 h en M1 se procedió a la realización de los experimentos. Para

ello, tras lavar un mínimo de dos veces para eliminar el remanente de neurotrofinas, se mantuvieron las células un mínimo de 4-5 h en medio M1 sin NGF previamente a la adición de los tratamientos indicados en cada caso, preparados en medio M1.

#### **4.2.2. Células de Schwann (SCs).**

Las SCs se aislaron a partir de nervio ciático de crías de rata Wistar de entre 2 y 5 días de edad siguiendo los métodos descritos en (Chan et al., 2001). Tras la extracción de los nervios procedentes de una camada (típicamente 10-12 animales), éstos se sometieron a disociación enzimática mediante digestión durante 15 min con 3 ml de colagenasa A (Roche) a una concentración de 3 mg/ml, seguida de otros 15 min de digestión en 3 ml de colagenasa con 10% Tripsina-EDTA (a concentración final de 0,025% de tripsina) (Gibco-Invitrogen). Posteriormente, se realizó una disociación mecánica por pipeteo con Pasteur de vidrio estrechada por calor, eliminándose las partes fibrosas y no digeridas mediante un filtrado a través de un colador de 70 µm de diámetro de poro (BD Falcon). Tras una centrifugación suave las células se resuspendieron en DMEM-10% FBS-HI y se sembraron en placas de cultivo Falcon (P-35 o P-60, en función del número de nervios procesados). Las células contaminantes fueron eliminadas mediante un ciclo de antimitótico (AraC, 25 µM, Sigma-Aldrich), que se añadió 16-24 h tras su siembra y se mantuvo durante los siguientes 2-3 días.

Tras pasar por un mínimo de dos ciclos de 48 h en medio libre de antimitóticos (DMEM con 10% de

FBS-HI) las células fueron levantadas con Tripsina-EDTA 0,05%. Tras ello, las células fueron sembradas en placas Falcon P-100 previamente recubiertas con Poli-L-Lisina, en caso de proceder a su posterior expansión; o directamente añadidas sobre cultivos de DRGNs en caso de ser utilizadas para el establecimiento de cocultivos.

En caso necesario, si la pureza obtenida en el paso anterior no era la adecuada, se procedió a un paso de eliminación selectiva de fibroblastos mediante un proceso de lisis mediada por complemento. Para ello, las SCs se resuspendieron en 1 ml de DMEM-10% FBS-HI, se les añadió anticuerpo contra Thy 1.1 (Sigma-Aldrich), que se une de manera específica a los fibroblastos, a una dilución de 1:1000, procediendo a su incubación durante 30 min a 37°C. A continuación, tras eliminar el medio por centrifugación, se añadió complemento de suero de conejo (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:8 en DMEM con 10% FBS-HI e incubando nuevamente durante 30 min a 37°C, para así proceder a la lisis de las células marcadas. Tras una centrifugación y resuspensión en el volumen indicado en función del número de placas, las células fueron directamente sembradas en placas Falcon P-100, en caso de proceder a su posterior expansión; o añadidas sobre cultivos de DRGNs tras eliminar el exceso de complemento, en caso de ser utilizadas para el establecimiento de cocultivos.

Para su mantenimiento y expansión en cultivo, las SCs se crecen en medio DMEM con 10% de FBS-HI y 40 µg/ml de Gentamicina (Genta-Gobens® 240, Normon), suplementado con 2 µM de Forskolin (Calbiochem) y 60 µg/ml de BPE

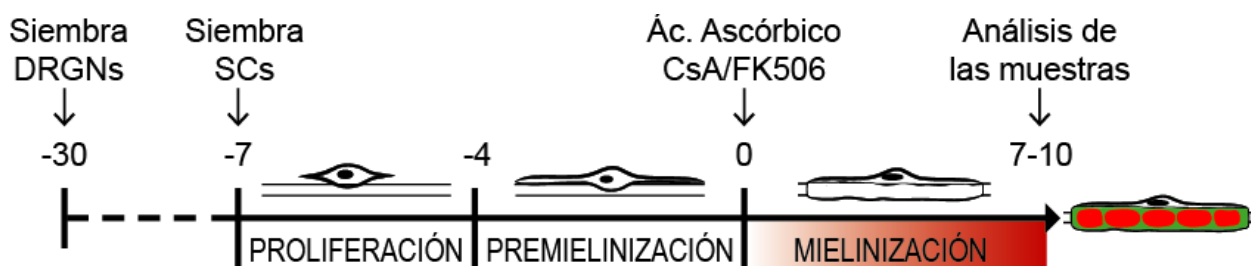
(Gibco-Invitrogen). El Forskolin estimula los niveles de AMPc y el BPE proporciona factores de crecimiento (esencialmente, GGF) que, en conjunto, imitan la presencia de los axones, induciendo la proliferación de las SCs. En todo caso, con objeto de minimizar las diferencias asociadas al envejecimiento y senescencia de los cultivos primarios, las células no fueron mantenidas en cultivo durante más de cinco pases.

#### **4.2.3. Cocultivos mielinizantes de neuronas de ganglio raquídeo con células de Schwann.**

Los cultivos conjuntos de neuronas y células de Schwann fueron establecidos de acuerdo con métodos descritos en la bibliografía (Chan et al., 2001), y esquematizado en la figura M-1. Las neuronas se extrajeron como se describe en el apartado 4.2.1. manteniéndose entre 15-20 días en cultivo para permitir la formación de una extensa red de axones, antes de agregar las SCs. Durante dicho periodo, se cambió el medio M1 cada 48-72 h, dejando en cada ocasión aproximadamente 1/3 de medio sin retirar (puesto que este medio condicionado favorece el mantenimiento de las neuronas).

Las SCs se aislaron como ha sido descrito en el apartado 4.2.2. Tras pasar por un mínimo de dos ciclos de 48-72 h en medio libre de antimetabólicos (DMEM con 10% de FBS-HI) las células fueron levantadas y sembradas sobre el cultivo de neuronas, estableciéndose así el cocultivo. Se añadieron aproximadamente unas 100000 células por pocillo en un volumen final de 200 µl de medio de Proliferación, teniendo cuidado de





**Figura M-1: Diseño experimental del establecimiento de cocultivos mielinizantes.** Curso temporal del establecimiento de cocultivos. Se muestran los días en cultivo, así como las distintas fases por las que van pasando las SCs durante el proceso. Se considera día 0 el momento de adición del ácido ascórbico, junto con los tratamientos correspondientes, siendo entonces cuando comienza la formación de la mielina.

depositarlas mayoritariamente encima de la red axonal.

Tras la siembra, los cocultivos se dejaron progresar durante un periodo de 7-10 días durante el cual las SCs proliferan, migran y se sitúan sobre los axones (fase de proliferación y premielinización). Durante este periodo, los cocultivos se mantuvieron en medio de Proliferación de cocultivos, durante el primer o los dos primeros cambios de medio, tras lo cual se les devolvió de nuevo a medio M1, renovándolo cada 48-72 h y dejando aproximadamente unos 400-500 µl de medio condicionado en cada cambio. Transcurrida esta etapa de proliferación y premielinización, y una vez que la red axonal estaba completamente cubierta de SCs (que llegan a posicionarse sobre los axones, ocupando el área que posteriormente van a mielinizar, pero sin empezar a formar la envuelta de mielina propiamente dicha), se procedió a la adición de ácido ascórbico a una concentración de 50 µg/ml (L-Ácido Ascórbico, Sigma-Aldrich), esencial para la formación de la lámina basal, etapa previa a la aparición de la envuelta de mielina. En este momento (día 0 del proceso de mielinización)

también se iniciaron los tratamientos que, junto con el ácido ascórbico, fueron renovados cada 48-72 h durante un periodo de entre 7 y 10 días, según el experimento.

#### **4.2.4. Neuronas de ganglio superior cervical (SCGNs).**

Las SCGNs se extrajeron de crías de rata Wistar de entre 2 y 5 días postnatales, siguiendo los métodos descritos en (Federoff et al., 1996). Brevemente, tras exponer la región ventral del cuello del animal, se retiró el tejido adiposo y muscular hasta dejar al descubierto la arteria carótida y el nervio vago. Bajo cada una de las arterias carótidas se encuentra el correspondiente ganglio superior cervical, que fue diseccionado teniendo cuidado de no arrastrar tejidos colindantes. Los ganglios así obtenidos fueron disociados con tripsina-EDTA 0,25% suplementada con 0,3 mg/ml de collagenasa A durante 45 min a 37°C, seguido de su disgregación mecánica mediante varias pasadas por una pipeta Pasteur estrechada por calor. Tras dejar un breve periodo de sedimentación para eliminar los restos de tejido no disgregado, las neuronas se resuspendieron en medio M1 y se

sembraron en placas previamente tratadas con Matrigel™, sembrando el equivalente de 2-3 ganglios por cada pocillo ( $\approx 50000$  células/pocillo). Tras un ciclo de 72 h con E2F, para eliminar en lo posible los fibroblastos acompañantes y dos ciclos de recuperación de 48 h en M1 se procedió a la realización de los experimentos. Para ello, tras 2 lavados para eliminar el exceso de neurotrofinas, se mantuvieron las células durante un mínimo de 4-5 h en medio M1 sin NGF para, a continuación, añadir los tratamientos indicados en cada caso, diluidos en medio M1.

## **5. Procedimientos.**

### **5.1. Análisis por Western Blot.**

Las muestras de cocultivos fueron homogeneizadas para ensayos de Western Blot en tampón RIPA y centrifugadas para eliminar la fracción insoluble. La concentración de proteínas fue determinada usando el ensayo del ácido bicinchonínico (BCA™ Protein Assay, Pierce) según las indicaciones del fabricante. Cantidades iguales de proteína de cada muestra (adecuadas para ajustarse al rango lineal de sensibilidad para cada anticuerpo en concreto) se mezclaron con tampón de carga Laemmli (reductor en los casos no especificados, y no reductor únicamente en el caso de las muestras destinadas a analizar MAG) y se desnaturalizaron por calor 5 min a 99°C.

En el caso de experimentos de inducción por NGF a tiempos cortos, tras retirar cuidadosamente el medio de cultivo las células se procesaron directamente en 100  $\mu$ l de tampón de carga Laemmli 1X suplementado con 1 mM de

ortovanadato sódico y calentado a 99°C. Tras un ciclo de congelación-descongelación, las muestras fueron trituradas utilizando una jeringa de 1 ml acoplada a agujas hipodérmicas BD Microlance™ 3 de 20G x 1", para eliminar la viscosidad derivada de la liberación de ácidos nucleicos, y cargadas en distinta cantidad en función del experimento y proteína a analizar.

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida al 6%, 8%, 10% ó 15%, dependiendo del peso molecular de la proteína de interés, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). A continuación las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN® BA85, 0,45  $\mu$ m, Whatman) durante 16 h a 4°C. Para comprobar la equivalencia de carga y confirmar la transferencia de las proteínas a las membranas, éstas fueron teñidas con rojo Ponceau S (Amresco).

Tras ser mantenidas un mínimo de 4 h en solución de bloqueo, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios durante 16 h a 4°C y, tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante tres lavados de 5 min en T-TBS a RT, con anticuerpos secundarios de asno contra IgG de ratón o de conejo conjugados con HRP (Jackson) a dilución 1:10000 en T-TBS-5% leche desnatada en polvo durante 1-3 h a RT. Tras tres lavados en T-TBS y un lavado en TBS, todos de 5 min a RT y en agitación, se procedió a su revelado mediante un kit de quimioluminiscencia (Immun-Star™ HRP Chemiluminiscent kit, Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante, obteniendo la señal

correspondiente mediante la exposición a películas autorradiográficas de baja o alta sensibilidad (Agfa Curix RP2 Plus o Amersham Hyperfilm ECL, respectivamente) dependiendo de la proteína a estudio. Para la cuantificación densitométrica de las bandas se empleó el programa informático NIH Image-J 1.43r (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). En determinados casos se utilizaron anticuerpos secundarios de cabra IRDye® contra IgG de ratón (IRDye® 800CW) o de conejo (IRDye® 680RD) de Li-Cor, diluidos 1:15000; obteniendo la señal por medio de un detector Odyssey® (Li-Cor).

## **5.2. Inmunoprecipitaciones.**

Placas Falcon P-100 con células en confluencia y con los tratamientos señalados en cada caso fueron lisadas en tampón de lisis para IP preenfriado a 4°C, temperatura que se mantuvo para el resto del procedimiento. Distintas concentraciones de detergente fueron probadas hasta dar con la concentración óptima. Tras una centrifugación en frío para eliminar la fracción insoluble, se procedió a la medición de la concentración proteica por medio de ensayo de BCA. Cantidades iguales de proteína total (indicadas en cada caso, pero siempre en un rango entre 100 y 500 µg) fueron alícuotadas en tubos *Protein LoBind 1,5 ml* (Eppendorf). De cada muestra se prepararon dos tubos, para la incubación por un lado con MC192 (aprox. 1 µg) y por otro con IgG normal de ratón (1,1 µg), como control de uniones inespecíficas. Dicha incubación se llevó a cabo durante 16 h en agitación orbital continua. A continuación, para la precipitación de los complejos formados se incorporó 15 µl por cada tubo de una suspensión 1:1 de anti-IgG de ratón conjugado a agarosa

(Sigma-Aldrich) en tampón de lisis de IP, y se incubó durante 1,5-2 h en agitación. Pasado dicho tiempo se procedió a una centrifugación de 5 min a 4000 rpm, seguida de un lavado resuspendiendo el precipitado en 1 ml de PBS-0,5% Tritón X-100 dejando incubarlo durante 5 min. Tras repetir este paso tres veces, se procedió a una última centrifugación de 5 min a 8000 rpm y a la eliminación de la mayor cantidad posible de sobrenadante. Seguidamente, las bolas depositadas se dispersaron en 25 µl de tampón Laemmli 1X, se hirvieron las muestras durante 5 min a 99°C para liberar los complejos inmunoprecipitados y, finalmente, éstos se resolvieron mediante SDS-PAGE, analizándose la presencia de las proteínas de interés por WB.

## **5.3. GST-Pull Down.**

Para la construcción de un plásmido de expresión de CypB fusionada a GST se utilizó la siguiente estrategia. En primer lugar, a partir de cDNA de células de Schwann se clonó la secuencia de CypB usando polimerasa de alta fidelidad Pfu (New England Biolabs) y los cebadores CypB-sentido y CypB-antisentido (Tabla M-1) que, además de flanquear la secuencia de dicho gen incorporaban dianas para las enzimas de restricción EcoRI en el extremo 5' y XhoI en el 3'. Tras la amplificación se purificó el producto mediante el kit MSB® Spin PCRapace (Invitex) y se añadió una adenosina protuberante en cada extremo 3' incubando 30 min a 70°C en presencia de dATP y polimerasa Taq (Biotools). El fragmento fue ligado en el plásmido pGEM®-T Easy (Promega).

Con el fin de generar la fusión a GST se procedió al subclonaje de la secuencia de CypB en el plásmido de expresión de proteínas de fusión pGEX-6P-1 (GE Healthcare). Para ello se cortó con las enzimas EcoRI y XhoI (New England Biolabs), se separó por tamaños en gel de agarosa y se purificaron los fragmentos del tamaño adecuado con un kit de extracción de gel JetQuick (Genomed). A continuación se defosforilaron los extremos de las secuencias con fosfatasa alcalina (kit rAPid, Roche), y se ligaron con T4 ADN ligasa (Promega). Con dicha construcción y con el plásmido pGEX-6P-1 vacío a modo de control se transformaron bacterias competentes BL21. Ambas construcciones fueron comprobadas por secuenciación.

Para la producción de proteína se aislaron colonias a partir de un cultivo en placa, creciéndolas en 5 ml de LB-Ampicilina durante 16 h a 37°, para luego expandir el cultivo a 50 ml de LB-Ampicilina, donde se crecieron aproximadamente 1 h, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (determinada mediante una OD de 0,9 a una longitud de onda de 600 nm). La producción de la proteína de fusión (y de GST salvaje) se indujo en ese momento, añadiendo IPTG (Sigma-Aldrich) a 250  $\mu$ M durante 3 h a 30°C.

Para la purificación de la fusión GST-CypB (o GST salvaje), se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron en tampón NETN preenfriado a 4°C. Las muestras fueron sometidas a 10 series de sonicación de 10 segundos cada una en un Soniprep 150 (MSE) a potencia 22, y centrifugadas para eliminar los restos. La presencia de las proteínas de interés en el sobrenadante fue

comprobada por tinción con Coomassie Brilliant Blue, tras su separación electroforética.

Para formar el agente precipitador se usaron bolas de Glutación-sefarosa (Santa Cruz Biotechnology). Para ello, se equilibraron 100  $\mu$ l de una suspensión de las mismas con 100  $\mu$ l de NETN, mezclando, dejando sedimentar y eliminando el sobrenadante. Tras repetir tres veces, se añadió un volumen final de 125  $\mu$ l de NETN fresco. De la suspensión final se añadieron 125  $\mu$ l a los sobrenadante conteniendo las proteínas de fusión (tanto a GST-CypB como a GST salvaje) y se incubó durante 1 h a 4°C en agitación orbital, seguido de tres centrifugaciones y lavados en NETN consecutivos. Los complejos generados (GST-glutación-sefarosa y CypB-GST-Glutación-sefarosa) se utilizaron para ensayar la interacción, añadiéndolos a extractos de células PC12 (500  $\mu$ g) y SCs (150  $\mu$ g) obtenidos a partir de placas Falcon P-100 con células en confluencia lisadas en tampón de lisis de IP preenfriado. Tras incubar durante 1-2 h a 4°C en agitación, los extractos fueron centrifugados 5 min a 4000 rpm, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo en NETN durante 5 min, paso que fue repetido 3 veces. Finalmente, tras una última centrifugación a 8000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los lechos de bolas en 50  $\mu$ l de tampón Laemmli 1X. Los resultados se analizaron por SDS-PAGE y WB.

#### **5.4. Tinciones inmunocitoquímicas.**

Las muestras fueron fijadas en PBS con 4% de paraformaldehído (Riedel-de Haën) durante 10 min, seguido de un lavado de 5 min en PBS-Ca-Mg, y permeabilizadas y bloqueadas en ABS en

presencia de 10% de suero de cabra (Sigma-Aldrich) y 0,1% de Tritón X-100 durante 30 min a RT. En el caso de muestras de cocultivos destinadas a la detección con anticuerpos frente a neurofilamento y P<sub>0</sub>, se añadió un paso adicional de deshidratación por metanol a -20°C durante 2 min previo al bloqueo. En ambos casos, tras tres lavados de 5 min en PBS-Ca-Mg, se procedió a la incubación con los anticuerpos.

Los anticuerpos primarios se prepararon a la dilución óptima de uso en ABS-10% suero de cabra y se incubaron durante 16 h a 4°C. Tras 3 lavados de 5 min en PBS-Ca-Mg a RT, se procedió a su revelado con los anticuerpos secundarios correspondientes, anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor®-488 o anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor®-546 (ambos 1:2000, Invitrogen), durante 30 min a RT. Tras 3 lavados con PBS-Ca-Mg de 5 minutos cada uno y un lavado final en agua Milli-Q, todos a RT, el montaje de los cristales sobre portaobjetos se llevó a cabo usando Pro-Long® Gold Antifade con DAPI incorporado (Invitrogen) para el marcaje simultáneo de los núcleos celulares. La adquisición de imagen fue llevada a cabo por medio de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i acoplado a una cámara Nikon Ds-Qi1Mc o bien mediante un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5. El tratamiento y análisis posterior de las imágenes se realizó mediante los programas informáticos Adobe Photosop CS4 y NIH Image-J 1.43r.

En todo caso, con el objeto de mantener la linealidad de la señal, los tiempos de exposición de

los diferentes canales de cada imagen fueron ajustados en las condiciones control, y mantenidos para el resto de condiciones del mismo experimento. En el caso de que fuese necesario aplicar alguna corrección posterior a la adquisición, las modificaciones fueron siempre lineales y aplicadas por igual a todas las imágenes a comparar.

### **5.5. Transfecciones y silenciamiento de proteínas.**

Para obtener el silenciamiento de p75<sup>NTR</sup> y CypB se usaron shRNAs diseñados específicamente para cada uno de los genes. Para su diseño, mediante la herramienta Ambion siRNA Target Finder ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)), se seleccionaron secuencias dentro de cada gen de 21 nt de longitud que comenzasen por un doble nt AA, y que además tuviesen entre un 40% y 50% de GC y no tuviesen repeticiones de tres o más nt iguales consecutivos. Se comprobó mediante la herramienta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que dichas secuencias no estuviesen presentes en otros genes. Se seleccionaron cuatro secuencias, así como una secuencia extra no relacionada (obtenida por permutación aleatoria de una de las secuencias), para cada uno de los genes. En base a estas secuencias, se diseñaron pares de oligonucleótidos con el siguiente esquema (5' → 3'): un oligonucleótido conteniendo la secuencia GATCC, para originar el extremo protuberante del sitio de restricción BamHI; los 19 nt de la secuencia diana (sin el AA inicial); un espaciador de 9 nt, necesario para el bucle de la horquilla (para el que

se escogió, basándose en la bibliografía, la secuencia TTCAAGAGA); la misma secuencia diana de 19 nt invertida; una serie de 6 T; y un nt C, para formar el extremo 3' recesivo del sitio de restricción XhoI. El oligonucleótido complementario se diseñó de forma equivalente, con la única diferencia de contener el extremo 5' protuberante del sitio de la enzima de restricción XhoI (TCGAG) al inicio de la secuencia y el extremo 3' recesivo del sitio BamHI (G) al final (Tabla M.1). Cada pareja de oligonucleótidos fue anillada utilizando 25 µg de cada uno en tampón MRB 1X durante 10 min a 68°C y dejando enfriar progresivamente hasta RT, dando lugar así a fragmentos cohesivos de ADN que permitieron su posterior clonaje dirigido en los vectores apropiados.

Para la expresión de shRNA se clonaron las construcciones en el vector pSUPER-GFP-PURO (Oligoengine), ligando con T4 ADN ligasa los oligonucleótidos anillados tras digerir el vector con las enzimas BglII y XhoI (los sitios de restricción de BglII y BamHI presentan extremos cohesivos compatibles). A continuación, tras una digestión con la enzima BglII para linealizar los plásmidos sin presencia de inserto, fueron amplificados para su uso mediante transformación en bacterias DH5α y purificados empleando el kit Genopure Plasmid Midi (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la generación de los plásmidos, se procedió a su secuenciación para verificar la autenticidad del inserto.

Células PC12 fueron transfectadas utilizando Lipofectamine™ 2000, siguiendo las indicaciones del fabricante para la transfección de plásmidos.

Tras 24 h se comprobaron los niveles de transfección mediante la visualización de células que expresan GFP en un microscopio de fluorescencia invertido (Leica DMIL). Tras 7 días, cambiando el medio de cultivo cada 48-72 h, las células fueron sometidas a experimentos de inducción por neurotrofina en presencia/ausencia de CsA en las condiciones anteriormente descritas, y los resultados analizados por WB. Para mejorar la eficiencia en el caso del silenciamiento de p75<sup>NTR</sup> se procedió a una selección de las células con una expresión estable del plásmido mediante la adición de puomicina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 µg/ml durante 7 días, renovando el antibiótico cada 48 h.

#### **5.6. Tinción de mielina por Negro Sudán.**

Tras fijar las muestras de cocultivos con PFA al 4% en PBS durante 10 min y lavar tres veces con PBS durante 5 min a RT, fueron tratadas con 0,1% de tetróxido de osmio (Sigma-Aldrich) en PBS durante 1 h a RT. A continuación se lavaron dos veces con PBS durante 5 min a RT y fueron sometidas a una deshidratación seriada, mediante incubaciones de 10 min en 25%, 50% y 70% de etanol en PBS. Las preparaciones deshidratadas se tiñeron durante 2 h a 4°C con 0,5% del colorante negro Sudán (Fluka), preparado en 70% de etanol, en agitación continua. Finalmente, se procedió a un lavado en etanol al 70% y al rehidratado, nuevamente con baños seriados en etanol al 50%, 25% y, finalmente, PBS. La observación y toma de imágenes se llevó a cabo con una cámara Nikon Digital Sight DS-5M acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TS100.



### **5.7. Inyecciones en nervio ciático de ratón *in vivo*.**

Ratones de la cepa Swiss recién nacidos (P1) fueron inyectados, de manera acorde a los métodos descritos en (Chan et al., 2001) con 5  $\mu$ l de CsA a una concentración de 250  $\mu$ M en tampón HBSS (Gibco-Invitrogen) con 5% de etanol. Se llevaron a cabo punciones subcutáneas en la pata trasera, cerca de la región trocánter mayor del fémur, inyectando hacia el extremo de la pata, a lo largo del nervio. La pata contralateral se utilizó a modo de control, inyectando etanol disuelto a la misma concentración. Tras 72 h (P4) se procedió a una segunda inyección con 7  $\mu$ l de las mismas soluciones. 48 h tras la segunda administración (P6) los animales fueron sacrificados y se extrajeron los nervios ciáticos, tomados desde la porción más próxima a la pelvis hasta la división con el nervio tibial. Los nervios fueron procesados de forma mecánica y tratados para la extracción y solubilización de proteínas en tampón RIPA. Las muestras se analizaron mediante WB para el análisis de proteínas de mielina, usando en cada caso la muestra control contralateral de cada animal como referencia. En total fueron pinchados y analizados 7 animales de una misma camada.

### **5.8. Ensayos en cámaras compartimentalizadas Campenot.**

Para establecer los cocultivos en compartimentos, se siguieron los métodos detallados en (Campenot, 1977). En primer lugar se realizaron surcos en la zona central de placas Falcon P-35 tratadas con colágeno, utilizando un “pin rake” (CAMP-PR, Tyler Research Corporation) consistente en 20

agujas acopladas en paralelo, con un espacio de aproximadamente 200  $\mu$ m entre ellas. Estos surcos delimitan los carriles a través de los cuales van a poder crecer los axones. Sobre dichos surcos se colocaron los separadores de teflón, concretamente el modelo CAMP10, de 20 mm de diámetro (Tyler Research Corporation), cuya superficie inferior se cubrió de grasa de vacío Dow Corning® (Sigma-Aldrich) mediante una jeringa BD Microlance™ 3 de 23G x 1” cortada por la mitad para eliminar el bisel y acoplada a un aplicador de grasa (CAMP-GLSS, Tyler Research Corporation) para obtener el sellado contra la superficie de la placa. De esta manera, se obtienen barreras de grasa que no permiten el paso de los fluidos, pero que pueden ser atravesados activamente por los axones de las neuronas. Además, se colocó una barrera utilizando la misma grasa, para aislar temporalmente el compartimento central. Tras la colocación de los separadores, se añadieron 400  $\mu$ l de medio E2F en cada uno de los compartimentos laterales, manteniéndolos en el incubador durante 24 h, para asegurar que no existieran pérdidas o fugas. Todos los medios utilizados en este tipo de cultivos fueron suplementados con 0,75 mg/ml de metilcelulosa (Sigma-Aldrich), para aumentar así la viscosidad de los mismos. Además, los medios correspondientes a los compartimentos laterales se realizaron con MEM sin rojo fenol (Gibco-Invitrogen), para poder monitorizar las posibles fugas entre compartimentos.

Tras extraer las neuronas DRG como se describe en el apartado 4.2.1., se sembraron 20000 células por cada placa en un volumen de 70-80  $\mu$ l de medio M1, disponiéndolas en el compartimento central de la cámara de teflón usando una aguja

BD Microlance™ 3 de 27G x ½” acoplada en una jeringa de 1 ml. Al día siguiente se procedió a incorporar 2,5 ml de medio E2F con 10 ng/ml de NGF en la región externa de la cámara, teniendo especial cuidado en que el volumen del medio supere la barrera del compartimento central, para que se establezca intercambio de fluidos. A partir de este momento, se cambiaron los medios cada 48 h, alternando dos ciclos con medio E2F y M1, y siempre utilizando medio sin rojo fenol y con 100 ng/ml de NGF en los compartimentos laterales y medio con rojo fenol y 10 ng/ml en el compartimento central-exterior. Tras la eliminación de las células acompañantes, y una vez que los axones habían atravesado las barreras de grasa para colonizar así los compartimentos laterales, se sembraron las SCs, extraídas como se describe en 4.2.2., y sembrando 10000 células por compartimento lateral, en un volumen final de 50 µl de medio M1, estableciendo el cocultivo de una manera similar a la descrita en el apartado 4.2.3.

Transcurridos 15 días desde la siembra de las SCs, y tras 15 días extra en presencia de ácido ascórbico y los correspondientes tratamientos, se llevaron a cabo tinciones inmunocitoquímicas para monitorizar la formación de mielina. Tras retirar los medios de cultivo y los teflones, se fijaron y permeabilizaron las células de la manera habitual, descrita en 5.4., directamente sobre la placa de cultivo. Posteriormente, tras eliminar los bordes de la placa, se continuó con el protocolo de inmunocitoquímica, sellando mediante un cristal de 25 mm de diámetro. El análisis y obtención de imágenes se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss).

Los medios retirados fueron conservados, para asegurar el aislamiento de las cámaras. Para ello se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, utilizando como blanco el medio sin rojo fenol.

### **5.9. Ensayos de cierre de herida y trans migración en cámaras de Boyden.**

Previo a la realización de los estudios de migración, las SC fueron preadaptadas durante 48 h con medio definido “Sato” (en el que se realizaron posteriormente los ensayos) en presencia de 10% FBS-HI. La siembra de las células se realizó depositando una gota de 30 µl conteniendo una concentración de  $1 \times 10^5$  células en el centro del pocillo en placas Falcon de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina, en medio definido suplementado con un 10% de FBS-HI, que es necesario para la adhesión de las células. Tras dejar que las células se adhiriesen al sustrato (1-2 h a 37°C), el pocillo se inundó añadiendo 200 µl adicionales del medio definido con suero. Al día siguiente, las células se pasaron a las condiciones finales establecidas para el ensayo, cambiando el medio por medio definido sin suero. Tras esperar 24 h adicionales, se retiró el medio anterior y se añadieron 250 µl de medio definido sin suero, en presencia de 5 µM de CsA, o el equivalente de etanol. Tras 30 min de preincubación se procedió a realizar una herida sobre la capa de células rascando suavemente con puntas de pipetas p200, se lavaron dos veces los pocillos con medio para eliminar las células desprendidas y se añadió el volumen final de medio con los diferentes tratamientos especificados en el ensayo.



El seguimiento del cierre de la herida se monitorizó mediante un microscopio modelo Cell Observer® z1, de Zeiss, acoplado a una cámara Cascade 1k (Photometrics). Dicho microscopio incorpora un sistema de incubación con CO<sub>2</sub> y mantiene la temperatura a 37°C, pudiendo realizar un seguimiento de células vivas. Durante 24 h se adquirieron imágenes cada 5 min utilizando el objetivo de 4x aumentos. La adquisición se realizó utilizando el software Axiovision 4.8 y el análisis posterior y cálculo de las distancias recorridas se realizó mediante Adobe Photoshop CS4 y NIH Image-J 1.43r.

También se analizó la capacidad de trans migración de las SCs mediante el uso de cámaras de Boyden, adaptando los protocolos descritos en (Yamauchi et al., 2004). Brevemente, se colocaron cámaras de Boyden, con membranas de tereftalato de polietileno con poros de 8 µm (BD Bioscience), tratadas con colágeno por ambas caras, sobre placas Falcon de 24 pocillos. Se añadió 500 µl de medio definido en el compartimento inferior, suplementado con 5 µM de CsA o etanol como control. En el compartimento superior se sembraron 2,5 x 10<sup>5</sup> SCs por pocillo en 750 µl de medio definido, nuevamente con 5 µM de CsA o etanol como control. Tras dejar 30 min para permitir la adhesión de las células, se añadieron los tratamientos correspondientes con neurotrofinas en el compartimento inferior de la cámara.

Tras 7 h de incubación (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Humedad) se procedió a eliminar las células del compartimento superior mediante un rascado con hisopos de algodón, fijándose las células de la parte inferior del filtro (células que han migrado)

con metanol. Tras teñir las células con cristal violeta o tinción de Giemsa, se contó el número de células en 5 campos diferentes de cada membrana y se obtuvieron imágenes con una cámara Nikon Digital Sight DS-5M acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TS100.

#### **5.10. Ensayos de dimerización y marcaje de membrana.**

Los ensayos de dimerización se adaptaron desde lo establecido en (Vilar et al., 2009a). Para ello a placas P-100 a confluencia de células PC12 o SCs, tratadas de la forma señalada en cada caso, se les añadió 250 µg/ml de EZ® Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Scientific) en PBS preenfriado, dejando proceder la incubación durante 30 min a 4°C, para marcar con biotina las proteínas de superficie. Tras un lavado con PBS preenfriado las células fueron lisadas con tampón de lisis de IP en presencia de 10 mM de IAA (Sigma-Aldrich). Tras la clarificación de las muestras mediante centrifugación en frío y la eliminación de la fracción insoluble, cantidades iguales de extracto fueron separadas en dos tubos por cada condición, y sometidas a IP utilizando MC192 según lo descrito en el apartado 5.2. Tras ello, uno de los tubos de cada condición se resuspendió en tampón Laemmli 1X con DTT (condiciones reductoras) y el otro en Laemmli 1X con IAA (para conservar los puentes disulfuro, y con ello los dímeros). Tras hervir las muestras 5 min a 99°C, los inmunoprecipitados se resolvieron por SDS-PAGE y se identificaron las proteínas biotiniladas por WB mediante incubación con estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific) durante 1 h a RT y posterior revelado.

## **6. Análisis de datos y procedimientos estadísticos.**

Todos los experimentos fueron repetidos un mínimo de 3 veces con resultados similares. En las representaciones gráficas de resultados se muestra la media de cada valor así como la desviación estándar o el error estándar de la media (SEM), según se indica en cada experimento concreto.

Como valor estadístico para representar diferencias significativas entre diferentes grupos se utilizó la prueba *t* de Student para muestras apareadas o desapareadas, en función del modelo experimental. Se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando se obtuvo una  $p \leq 0,05$ . En las diferentes figuras, se han considerado tres niveles de significación, para valores de  $p \leq 0,05$  (\*), de  $p \leq 0,01$  (\*\*) o de  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

## **7. Animales de experimentación y consideraciones éticas.**

Todos los animales empleados en el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron producidos y criados por el Servicio de Animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

La producción, mantenimiento y el sacrificio de los animales fue realizado acorde con las normativas europeas vigentes en cuestiones de ética en animales de experimentación (recogidas en el RD 1201/2005), y se mantuvo especial atención en respetar los criterios de reemplazo, reducción y refinamiento.

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-----3')
CypB	Sentido	CGGGAATTCAAGGTGCTCTTCGCCGCCGCC
	Antisentido	CGGCTCGAGCTACTCCTTGGCAATGGCAAAGG
CypB-shRNA-119	Sentido	<u>GATCC</u> AGTCACAGTCAAGGTATAC TTCAAGAGA GTATACCTTGACTGTGACTTT TTTT <u>C</u>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> AAAA AAAGTCACAGTCAAGGTATAC TCTCTTGAA GTATACCTTGACTGTGACT <u>G</u>
CypB-shRNA-131	Sentido	<u>GATCC</u> GGTATACTTTGATTTCCTAA TTCAAGAGA TTGGAAATCAAAGTATACCTT TTTT <u>C</u>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> AAAA AAGGTATACTTTGATTTCCTAA TCTCTTGAA TTGGAAATCAAAGTATACC <u>G</u>
CypB-shRNA-581	Sentido	<u>GATCC</u> GGATGTGATCATTGTAGAC TTCAAGAGA GTCTACAATGATCACATCCTT TTTT <u>C</u>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> AAAA AAGGATGTGATCATTGTAGAC TCTCTTGAA GTCTACAATGATCACATCC <u>G</u>
CypB-shRNA-820	Sentido	<u>GATCC</u> CTCCTACCAATGCTGATAT TTCAAGAGA ATATCAGCATTGGTAGGAGTT TTTT <u>C</u>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> AAAA AACTCCTACCAATGCTGATAT TCTCTTGAA ATATCAGCATTGGTAGGAG <u>G</u>
CypB-shRNA-Scramble	Sentido	<u>GATCC</u> CAAGCGTAAATGTGAATGT T TCAAGAGA ACATTCACATTACGCTTGTT TTTT <u>C</u>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> AAAA AACAAGCGTAAATGTGAATGT TCTCTTGAA ACATTCACATTACGCTTG <u>G</u>

Nombre	Orientación	Secuencia (5'-----3')
p75-shRNA-537	Sentido	<u>GATCC</u> <b>ACAGAACACAGTGTGTGAA</b> <i>TTCAAGAGA</i> <b>TTCACACACTGTGTTCTGTTT TTTT C</b>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> <b>AAAA AAACAGAACACAGTGTGTGAA</b> <i>TCTCTTGAA</i> <b>TTCACACACTGTGTTCTGT G</b>
p75-shRNA-1219	Sentido	<u>GATCC</u> <b>CATATAGACTCCTTTACCC</b> <i>TTCAAGAGA</i> <b>GGGTAAAGGAGTCTATATGTT TTTT C</b>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> <b>AAAA AACATATAGACTCCTTTACCC</b> <i>TCTCTTGAA</i> <b>GGGTAAAGGAGTCTATATG G</b>
p75-shRNA-1962	Sentido	<u>GATCC</u> <b>CCACAGGAAGAACAAATGA</b> <i>TTCAAGAGA</i> <b>TCATTTGTTCTTCTGTGGTT TTTT C</b>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> <b>AAAA AACCACAGGAAGAACAAATGA</b> <i>TCTCTTGAA</i> <b>TCATTTGTTCTTCTGTGG G</b>
p75-shRNA-2315	Sentido	<u>GATCC</u> <b>CACTATACTACATTACACA</b> <i>TTCAAGAGA</i> <b>TGTGTAATGTAGTATAGTGT TTTT C</b>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> <b>AAAA AACACTATACTACATTACACA</b> <i>TCTCTTGAA</i> <b>TGTGTAATGTAGTATAGTG G</b>
p75-shRNA-Scramble	Sentido	<u>GATCC</u> <b>CAAAAGAGAGAGAGTCTCT</b> <i>TTCAAGAGA</i> <b>AGAGACTCTCTCTCTTTTGTT TTTT C</b>
	Antisentido	<u>TCGAG</u> <b>AAAA AACAAAAGAGAGAGAGTCTCT</b> <i>TCTCTTGAA</i> <b>AGAGACTCTCTCTCTTTTG G</b>

**Tabla M-1:** Listado de oligonucleótidos utilizados. Se muestran las secuencias 5'→3'. En los oligonucleótidos para la generación de vectores de expresión de shRNAs se muestran las dianas de restricción subrayadas, la secuencia del bucle en cursiva y la secuencia diana de 19 nts (o su complementaria en el oligonucleótido antisentido) en negrita. Las cifras de cada par de oligonucleótidos se corresponden con la posición del primer nucleótido dentro de la secuencia del ARN mensajero diana. Las secuencias scramble se originaron a partir de la permutación aleatoria de las secuencias diana CypB-shRNA-119 y p75-shRNA-537.



# *Resultados*



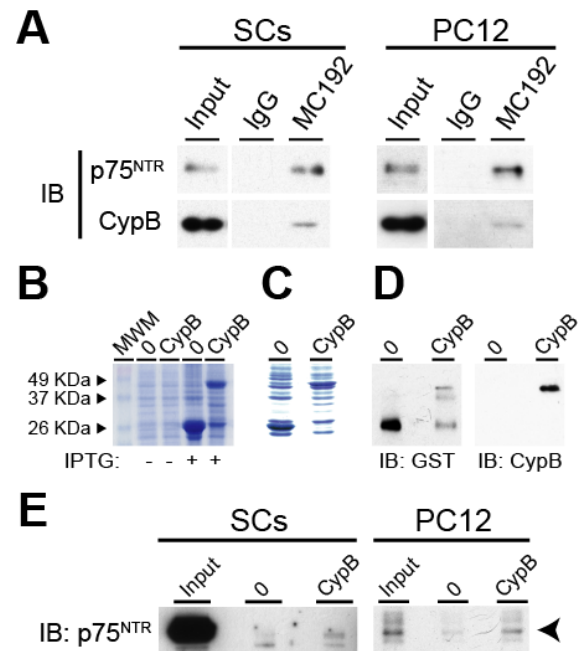
## 1. Interacción física entre el receptor $p75^{NTR}$ y Ciclofilina B.

En un estudio previo realizado en el laboratorio se realizó una búsqueda de amplio espectro de interactores del receptor de neurotrofinas  $p75^{NTR}$ . A tal efecto, se sometieron grandes cantidades de extractos tanto de células PC12 como de médulas espinales de embriones de rata a un sistema de columnas de afinidad donde, tras el paso por una columna conteniendo  $\gamma$ -globulinas bovinas y otra consecutiva con IgG de ratón para eliminar las interacciones inespecíficas, se enfrentaron a una columna conteniendo el anticuerpo MC192, que reconoce de manera específica  $p75^{NTR}$ . Tras eluir los elementos retenidos en esta última columna, se procedió a un análisis mediante espectrometría de masas de los mismos. Entre los diferentes péptidos reconocidos se pudo identificar a CypB, elemento perteneciente a la familia de las inmunofilinas cuya posible interacción con  $p75^{NTR}$  no había sido identificada previamente.

### 1.1. CypB interacciona con $p75^{NTR}$ .

Con el fin de confirmar la interacción física entre CypB y  $p75^{NTR}$  se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo monoclonal MC192, específico de  $p75^{NTR}$ . Tras inmunoprecipitar el receptor de neurotrofinas y lavar para eliminar uniones inespecíficas se procedió a determinar la presencia de CypB en el extracto precipitado mediante WB. Este procedimiento se llevó a cabo tanto en extractos solubilizados de células PC12 como de SCs primarias en cultivo. En condiciones nativas se pudo detectar la presencia de CypB en los

inmunoprecipitados de MC192, indicando que  $p75^{NTR}$  interacciona físicamente con CypB. A modo de control se enfrentaron los extractos a un anticuerpo inespecífico (IgG de ratón, en este caso) no obteniéndose precipitación de CypB en



**Figura R-1:  $p75^{NTR}$  interacciona con CypB.** (A) Extractos de SCs (150  $\mu$ g) o PC12 (500  $\mu$ g) fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo MC192, específico de  $p75^{NTR}$ , y resueltos mediante WB. Se pudo comprobar que en ambos tipos celulares al inmunoprecipitar  $p75^{NTR}$  se precipitó también CypB. (B) Tinción de Coomassie en gel de extractos de bacterias BL21 transfectadas con plásmidos para la expresión de proteínas GST-recombinantes y cuya producción se induce por la adición de IPTG. (MWM: marcadores de peso molecular; 0: GST salvaje; CypB: GST-CypB). (C) Tinción de Coomassie en gel mostrando las proteínas de fusión purificadas mediante su unión a resina de glutatión-sefarosa. (D) Comprobación mediante WB de la presencia en los constructos generados de reactividad frente a GST y CypB. (E) Ensayo de arrastre utilizando extractos de SCs (150  $\mu$ g) o PC12 (500  $\mu$ g), empleando como cebo resinas de Glutatión-sefarosa cargadas con GST-CypB o GST salvaje como control. Tras recuperar la fracción unida se comprobó la presencia de  $p75^{NTR}$  mediante WB. La banda con el tamaño adecuado (punta de flecha) sólo se pudo observar cuando se utilizaba como cebo GST-CypB.

ninguno de los casos estudiados (FIG R-1A).

Para una mayor caracterización de esta interacción, se llevaron a cabo ensayos en condiciones *in vitro*, utilizando un método de arrastre usando proteínas de fusión a GST. Para ello se generó una construcción integrando la secuencia de CypB en un plásmido de expresión de proteínas de fusión a GST. Una vez introducida y expresada, para asegurar que el constructo generado era correcto, se comprobó que la proteína de fusión presentaba el peso molecular adecuado mediante tinciones de Coomassie en gel, (FIG R-1B y R-1C). Además, se comprobó su reactividad frente a GST y a CypB mediante WB (FIG R-1D), para así asegurar que las proteínas estaban siendo expresadas correctamente.

La proteína de fusión, unida a resinas de glutatión-sefaraosa (a modo de agente precipitante), fue posteriormente utilizada como cebo en ensayos de arrastre, utilizando extractos solubilizados de células PC12 o SCs como diana. Tras descartar las fracciones no unidas y someter a los correspondientes lavados para eliminar las uniones inespecíficas, se resolvió la fracción eluida por SDS-PAGE y se determinó la presencia de p75<sup>NTR</sup> mediante WB. En estas condiciones se pudo detectar presencia del receptor de neurotrofinas al utilizar como cebo la proteína de fusión GST-CypB, mientras que no se encontró en los controles correspondientes utilizando GST salvaje. Dicha interacción pudo ser observada nuevamente tanto al utilizar extracto de células PC12 como de SCs (FIG R-1E), confirmando nuevamente el resultado obtenido por inmunoprecipitación de p75<sup>NTR</sup>.

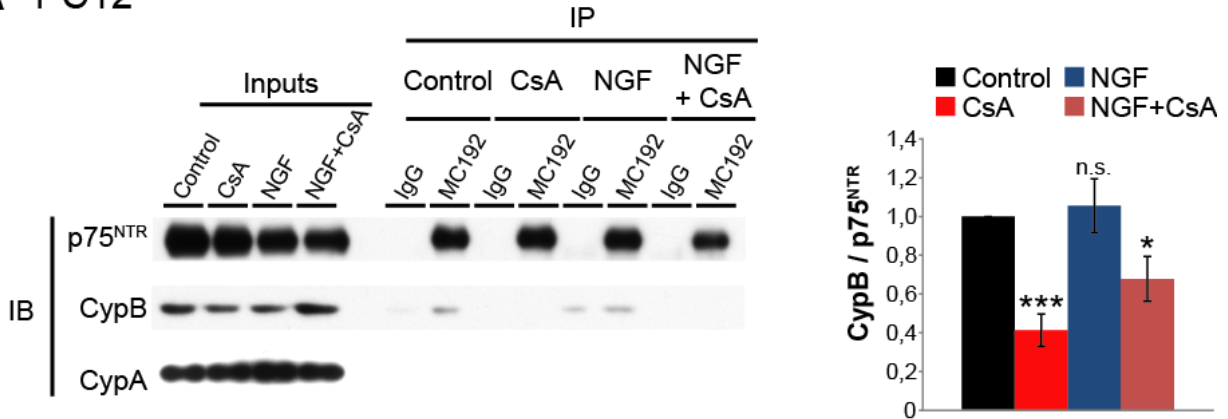
### 1.2. La interacción entre p75<sup>NTR</sup> y CypB está modulada por la unión de CsA.

Con objeto de estudiar la relevancia que pudiera tener la unión de otros elementos sobre la interacción observada, se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones en presencia de NGF, como ligando de p75<sup>NTR</sup>, así como de CsA, como agente inhibidor con la capacidad de unirse a CypB. La unión de CsA a las ciclofilinas estimula la formación de un complejo ternario con calcineurina, lo que inhibe a esta fosfatasa, y, en último lugar, desencadena la respuesta de inmunosupresión. Además dicha unión también se demuestra capaz de impedir la interacción entre ciclofilinas y diferentes elementos, como ocurre en el caso de sinapsina I (Lane-Guermonprez et al., 2005). Por todo ello, se quiso comprobar si la unión de CsA y/o NGF serían capaces de afectar de algún modo a la interacción observada entre CypB y p75<sup>NTR</sup>.

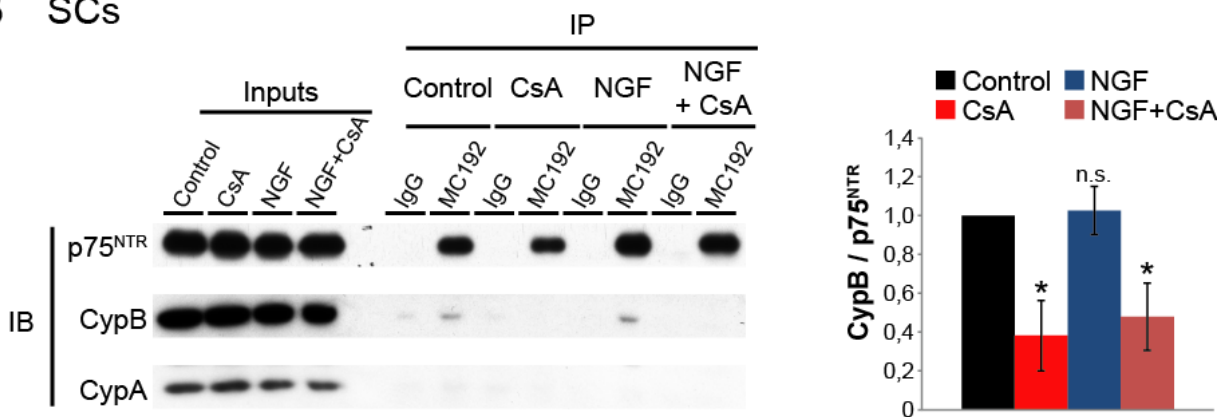
Con este fin, células PC12 fueron preincubadas durante 1 h con CsA, tiempo suficiente para la unión de dicho elemento a las ciclofilinas. En estas condiciones, se pudo observar una notoria disminución, estadísticamente significativa, de la cantidad de CypB que se detectaba al inmunoprecipitar p75<sup>NTR</sup> (FIG R-2A), obteniéndose aproximadamente un 60% menos de cantidad de CypB precipitada, en comparación a la obtenida en condiciones control. Por otro lado, en ausencia de CsA la adición de NGF, a una concentración de 100 ng/ml y durante 5 min, no provocó una modulación significativa de la interacción observada, no encontrando diferencias en los niveles de coimmunoprecipitación de CypB



## A PC12



## B SCs



**Figura R-2: CsA modula la coimmunoprecipitación de CypB con p75<sup>NTR</sup>.** Células PC12 (A) o SCs (B) fueron pretratadas durante 1 h con 5  $\mu$ M de CsA y posteriormente tratadas o no con 100 ng/ml de NGF durante los últimos 10 min. Extractos de células PC12 (500  $\mu$ g) o SC (100  $\mu$ g) fueron sometidos a inmunoprecipitación usando el anticuerpo MC192 o IgG como anticuerpo no relacionado. Los inmunoprecipitados se analizaron por WB, observando los niveles de p75<sup>NTR</sup> para comprobar el grado de inmunoprecipitación, de CypB como proteína de interés y de CypA como control de especificidad. En los paneles derechos se muestra la cuantificación densitométrica de los niveles de CypB en los inmunoprecipitados de p75<sup>NTR</sup> de diferentes experimentos (n=5 y n=4 para PC12 y SCs, respectivamente). Los datos (media  $\pm$  SEM) están normalizados por la cuantificación de los niveles de p75<sup>NTR</sup>, y a su vez referidos a la condición control.

frente a los obtenidos en condiciones control. Cuando se incorporó NGF en presencia del pretratamiento de CsA, combinando ambos factores, se pudo apreciar nuevamente un menor nivel de coimmunoprecipitación comparado con el obtenido en condiciones control, pero significativamente superior al encontrado al añadir únicamente CsA. Resultados similares fueron obtenidos cuando el estudio se realizó utilizando cultivos primarios de SCs (FIG R-2B). De todo ello se puede deducir que, de manera similar a lo

observado en otros casos como en la interacción entre CypB y sinapsina I, la unión de CsA es capaz de alterar la unión de CypB a otras proteínas, en este caso p75<sup>NTR</sup>.

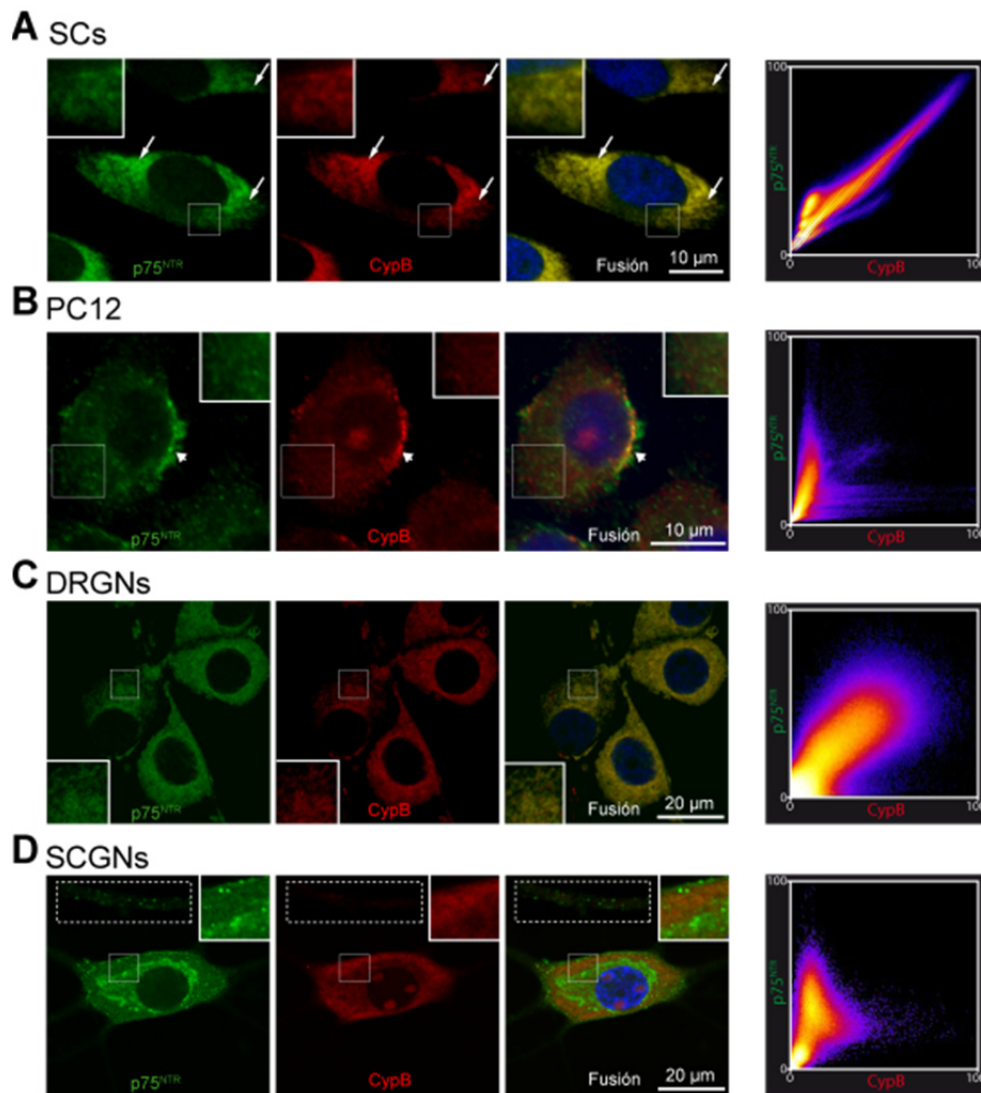
### 1.3. CypB y p75<sup>NTR</sup> se localizan juntos a nivel subcelular, en función del tipo celular.

Las técnicas empleadas hasta el momento indican una interacción física entre los elementos estudiados, aunque no demuestran que dicha

interacción ocurra en condiciones celulares, al provenir de extractos solubilizados. Para tratar de demostrar una posible interacción entre ambas proteínas en el ámbito celular, se realizaron tinciones inmunocitoquímicas para visualizar mediante fluorescencia la localización subcelular de dichas proteínas. Para la visualización de p75<sup>NTR</sup> se usó de nuevo el anticuerpo MC192, que reconoce la proteína en su región extracelular y en su forma madura. En células PC12 en condiciones normales, p75<sup>NTR</sup> presentó una distribución en la membrana citoplasmática, así como en estructuras subcelulares de apariencia vesicular, que presentan gran similitud morfológica con estructuras de las rutas de secreción y señalización (FIG R-3B). Por otro lado, en SCs se pudo observar que p75<sup>NTR</sup> se distribuía mayoritariamente por todo el interior celular, con una menor decoración de la membrana que la apreciable en PC12 (FIG R-3A). En el caso de CypB, si bien las descripciones bibliográficas iniciales la señalaban esencialmente como una proteína residente en el retículo endoplasmático, posteriormente ha sido caracterizada su presencia en otras localizaciones en distintos tipos celulares. En los tipos celulares aquí analizados, se pudo observar que CypB se distribuía de manera puntiforme, en compartimentos intracelulares repartidos por todo el citoplasma. En PC12, además, destacó la presencia de acúmulos intranucleares, en distribuciones que asemejaban estructuras nucleolares. Dichas estructuras nucleares no fueron apenas apreciables en SCs, sin embargo.

Mediante la realización de tinciones inmunocitoquímicas frente a ambas proteínas de manera conjunta se pudo apreciar un elevado

grado de colocalización entre ambas en SCs primarias (FIG R-3A). La coincidencia de señales de ambos anticuerpos, además, se pudo identificar en estructuras subcelulares diferenciadas de apariencia vesicular (recuadro FIG R-3A). Este alto nivel de superposición entre la señal de ambos anticuerpos se puso también de manifiesto al realizar un análisis de la distribución de señales de tipo fluorogramas, que indicaron la existencia de una colocalización casi total. Asimismo, mediante herramientas bioinformáticas se pudo constatar que dichos niveles de colocalización eran sumamente elevados, lo que se comprobó mediante dos indicadores diferentes como son los coeficientes de Pearson y Manders (Tabla R-1). A diferencia de lo observado en estas células, al analizar ambos marcadores de manera conjunta en células PC12 se determinó que p75<sup>NTR</sup> y CypB apenas se localizaban de manera conjunta (FIG R-3B), presentando un nivel de superposición destacadamente inferior al observado en SCs. Sin embargo, el análisis en detalle de la distribución de las señales inmunoreactivas permitió localizar un cierto nivel de superposición entre ambas proteínas en determinadas estructuras discretas con alto grado de presencia de p75<sup>NTR</sup> cercanas a la membrana citoplasmática. Este cierto nivel de superposición entre la señal de ambos anticuerpos se puso de manifiesto de manera más clara al realizar un análisis de la distribución de señales de tipo fluorogramas, donde se aprecia la existencia de cierto nivel de colocalización parcial, que podría proceder de las citadas estructuras (FIG R-3B, punta de flecha). Igualmente, el análisis bioinformático de las imágenes pone de manifiesto que el nivel de colocación de ambas señales, si bien bajo, no es del todo despreciable (Tabla R-1).



**Figura R-3: p75<sup>NTR</sup> y CypB colocalizan en estructuras subcelulares en función del tipo celular.** Tinciones inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos contra p75<sup>NTR</sup> (verde) y CypB (rojo). Para cada imagen se muestra el fluorograma, que representa la distribución de señales para cada canal. Los núcleos celulares se visualizan mediante tinción con DAPI (azul). Para cada grupo de imágenes, la zona recuadrada se muestra con una mayor magnificación en una de las esquinas. **(A)** Imagen de microscopia convencional de SCs, donde se observó un elevado grado de superposición entre ambas señales, detectándose en estructuras localizadas en el interior celular (flechas y magnificación). **(B)** Imagen de tinciones equivalentes en PC12 donde, por el contrario, se encontraron niveles muy bajos de colocalización entre ambas proteínas, aunque sí se pudo detectar cierto grado de colocalización en determinadas zonas (cabeza de flecha) así como en los diagramas de dispersión. **(C)** Imagen de microscopía confocal de neuronas DRG donde, de manera similar a SCs, se apreció un elevado nivel de colocalización entre ambas proteínas. **(D)** Imagen de microscopía confocal de neuronas SCG, que mostraron un patrón de distribución similar al observado en PC12, con niveles muy bajos de coincidencia. En los axones (recuadro discontinuo) no se pudo observar apenas presencia de CypB.

Dado el interés que presenta como potencial diana terapéutica p75<sup>NTR</sup> en neuronas, se llevaron a cabo ensayos de tinción inmunocitoquímica en cultivos primarios de neuronas de rata, arrojando también resultados dispares. En neuronas sensoriales

procedentes de DRGs, se observó un nivel significativo de colocalización entre el receptor de neurotrofinas y CypB, con un patrón de distribución similar al obtenido en SCs, observando una elevada superposición en la región

citoplasmática, si bien se obtuvo una menor colocalización a nivel de la membrana celular, donde se observó presencia de p75<sup>NTR</sup> pero no de CypB (FIG R-3C). Sin embargo, en neuronas simpáticas de SCGs se observaron unos niveles de colocalización muy discretos (FIG R-3D), similares a los observados en células PC12. Los valores de colocalización de ambos tipos neuronales concordaron con las observaciones, en ambos casos (Tabla R-1).

Tipo celular	Pearson's	Manders' R
SCs	0,785	0,889
PC12	0,174	0,421
DRGNs	0,616	0,787
SCGNs	0,414	0,598

**Tabla R-1. Valores de los coeficientes de correlación para los distintos tipos celulares.** El coeficiente de Pearson varía entre -1 (correlación negativa total) y 1 (100% de correlación positiva). El coeficiente *r* de Manders varía entre 0, para valores de mínimos de coincidencia de señal en ambos canales, y 1, para una correspondencia absoluta entre los mismos.

La adición de CsA a las células es un evento que modula la localización de CypB. En otros tipos celulares se ha descrito que, en presencia de dicha droga, CypB se redistribuye mayoritariamente a la región yuxtannuclear, donde va a colocalizar con marcadores de retículo endoplasmático, así como al interior del núcleo (Le Hir et al., 1995); además, otros autores han podido detectar un incremento en la secreción a fluidos extracelulares de la misma (Price et al., 1994). En los cultivos primarios de SCs utilizados se pudo apreciar cómo el tratamiento con CsA durante 1h resultaba en una destacada redistribución de CypB, con la aparición de acúmulos intracelulares de un mayor tamaño

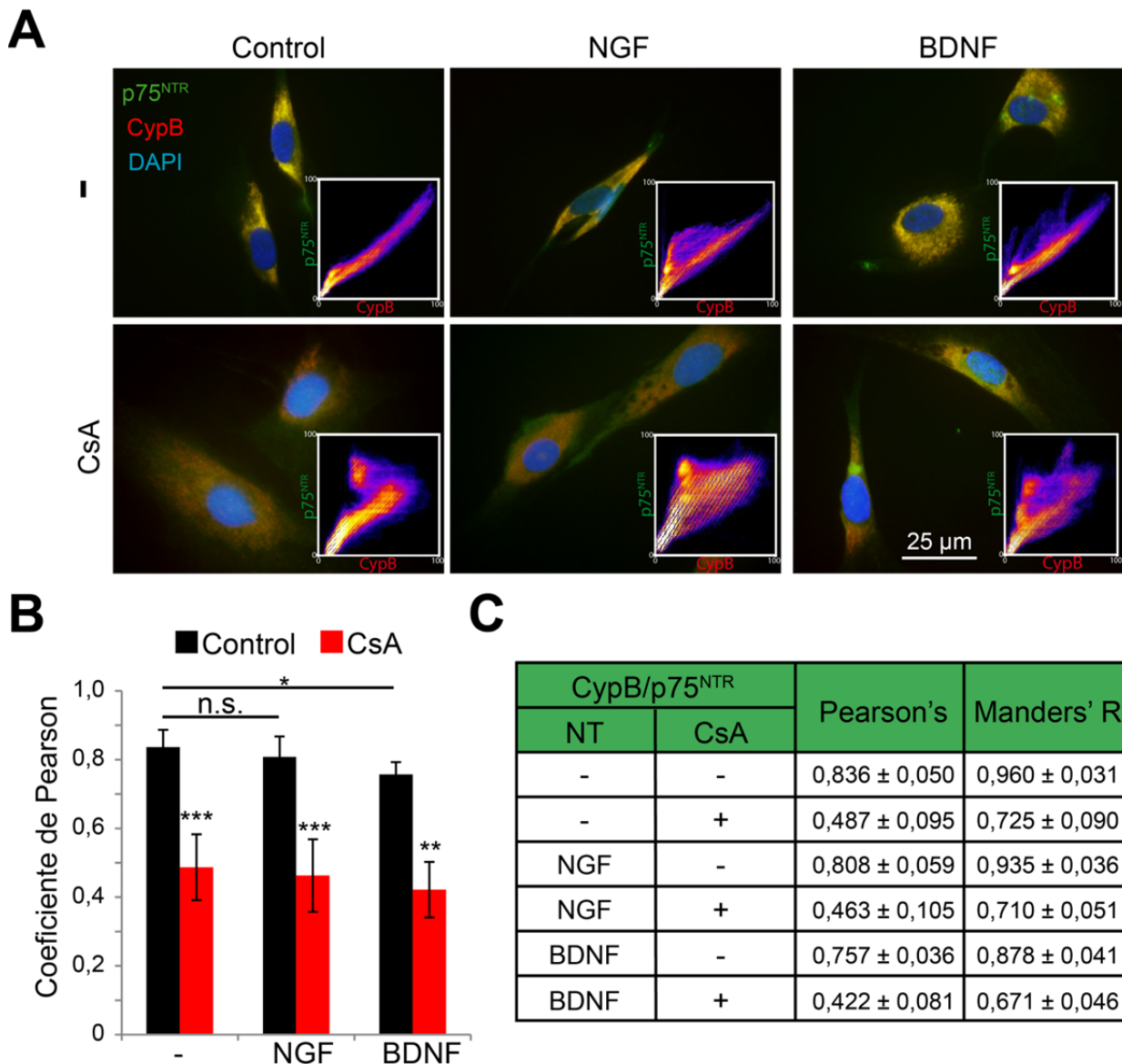
que en condiciones control, con tendencia a localizarse en regiones próximas al núcleo. No se apreciaron, sin embargo, cambios en la distribución de p75<sup>NTR</sup> al pretratar las SCs con CsA. Al comprobar el nivel de superposición en las señales de ambos elementos, CypB y p75<sup>NTR</sup>, se pudo determinar que la adición de CsA era capaz de producir una importante deslocalización, disminuyendo los niveles de coincidencia de manera apreciable, tanto a nivel de coincidencia de señales (FIG R-4A) como según los coeficientes de superposición de Pearson y *r* de Manders con respecto a los obtenidos en ausencia de CsA (FIG R-4B y R-4C). Por otro lado, la adición de neurotrofinas a las células, tanto NGF como BDNF durante 10 min, aunque no produjo cambios drásticos en la distribución de CypB o p75<sup>NTR</sup>, sí que fue capaz de causar una cierta disminución en la colocalización de ambas proteínas, como se pone especialmente de manifiesto mediante el análisis de fluorogramas, donde se pueden observar más claramente las diferencias en la co-distribución de p75<sup>NTR</sup> y CypB (FIG R-4A). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en los coeficientes de Pearson o *r* de Manders con el tratamiento con neurotrofinas, mientras que la adición combinada de CsA y neurotrofinas nuevamente provocó drásticas disminuciones en los citados coeficientes, determinando un importante descenso en la colocalización de CypB y p75<sup>NTR</sup> (FIG R-4B y C).

Por tanto, de una forma similar a lo observado en los experimentos de inmunoprecipitación, la presencia de CsA fue capaz de modular negativamente la interacción entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, al menos en los tipos celulares donde se puede

observar dicha interacción en condiciones normales.

Para comprobar la especificidad de la colocalización subcelular entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, se llevaron a cabo ensayos de colocalización similares a los anteriores, pero analizando en este

caso el patrón de distribución de CypA. En SCs en condiciones basales, CypA presentó una distribución de tipo puntiforme, pero mucho más dispersa a lo largo de todo el citoplasma que CypB. A diferencia de lo observado en el caso de CypB, no se pudo apreciar colocalización entre CypA y p75<sup>NTR</sup>. En este caso, la presencia de CsA



**Figura R-4: El tratamiento con CsA modula la colocalización de p75<sup>NTR</sup> y CypB en SCs.** (A) Tinción inmunocitoquímica de SCs tratadas con NGF o BDNF (100 ng/ml durante 10 min), en presencia o ausencia de CsA (5 μM durante 1h). La colocalización entre p75<sup>NTR</sup> (verde) y CypB (rojo) disminuye de manera notoria al bloquear CypB con CsA, mientras que el tratamiento con neurotrofinas tiene un efecto más sutil, solo apreciable en los análisis de distribución de señales por fluorogramas (recuadros). (B) Cambios en el Coeficiente de Correlación de Pearson en función de los distintos tratamientos. Se muestran los datos (n = 5) como media ± SD (C) Distribución de los coeficientes de colocalización de Pearson y R de Manders en función de los distintos tratamientos.



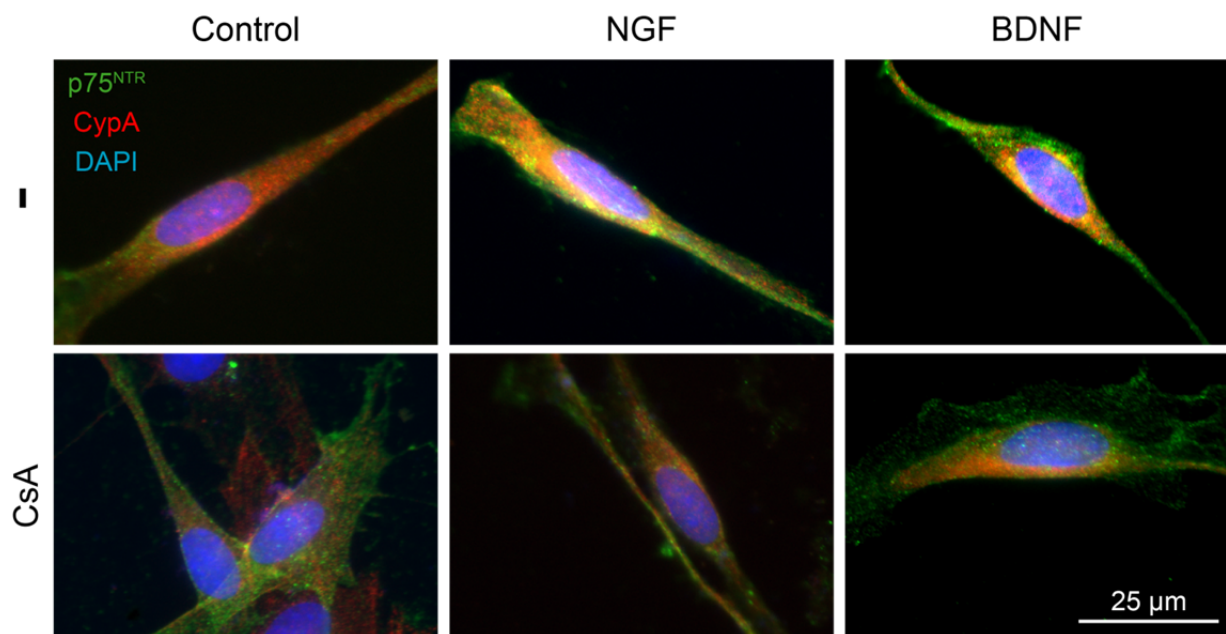
no fue capaz de originar cambios aparentes en la distribución de CypA en el interior celular. De igual manera, no se pudieron observar diferencias significativas en los patrones de distribución de CypA o en su posible colocalización con  $p75^{NTR}$  al tratar las células con NGF o BDNF (FIG R-5).

En células PC12, a pesar de no observarse el mismo grado de colocalización entre  $p75^{NTR}$  y CypB que en las SCs (FIG R-6A), se pudo determinar que los niveles de coincidencia entre ambas aumentaban significativamente en presencia de neurotrofinas, tanto NGF como BDNF, incrementando los coeficientes de superposición tanto de Pearson como  $r$  de Manders. Nuevamente, el tratamiento con CsA de manera previa a la adición de neurotrofinas fue capaz de eliminar ese incremento, obteniendo niveles de coincidencia incluso inferiores a los observados en condiciones

control (FIG R-6B y 6C).

### **2. Interacción funcional entre el receptor $p75^{NTR}$ y Ciclofilina B.**

Puesto que el objetivo principal de buscar de nuevos elementos interactores con el receptor de neurotrofinas  $p75$  era profundizar en sus rutas y mecanismos de señalización, resultaba de especial interés comprobar la posible implicación de CypB en dichas rutas y mecanismos. Para ello, se aprovechó la posibilidad existente de utilizar la droga inmunosupresora CsA como agente bloqueante de CypB. Como ya ha sido mencionado en apartados anteriores, la unión de CsA es capaz de bloquear la actividad enzimática de CypB y, además, es responsable de permitir nuevas interacciones como la que ocurre con la fosfatasa calcineurina. Como añadido, en el modelo de interacción mostrado en la primera

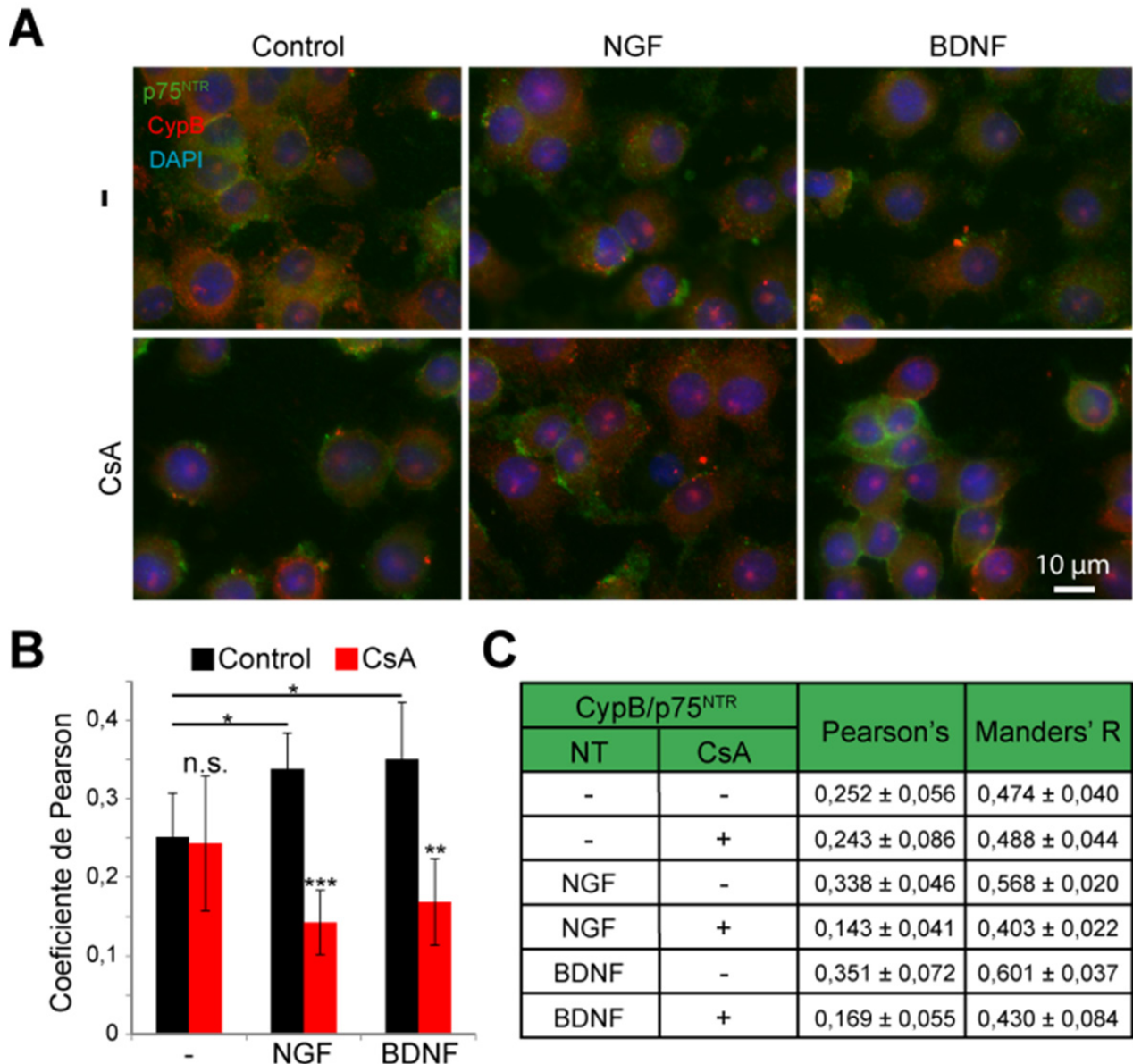


**Figura R-5. CypA no colocaliza con  $p75^{NTR}$  en SCs.** Tinción inmunocitoquímica frente a CypA (rojo) y  $p75^{NTR}$  (verde) en SCs tratadas con NGF o BDNF (100 ng/ml durante 10 min), en presencia o ausencia de CsA (5  $\mu$ M durante 1h). CypA, a diferencia de CypB, no colocaliza con  $p75^{NTR}$  en SCs en reposo. Ninguno de los tratamientos produjo cambios aparentes ni en la localización de CypA ni en su grado de coincidencia con  $p75^{NTR}$ .

parte de los resultados de esta tesis se ha podido determinar que la presencia de CsA reduce en gran medida la interacción entre ambos elementos, lo cual podría tener implicaciones en la señalización mediada por  $p75^{NTR}$ .

Como modelo de señalización a través de  $p75^{NTR}$

se diferenciaron los experimentos en dos bloques diferentes. Por un lado se analizaron las posibles acciones que pudiera tener la unión de CsA en la respuesta colaborativa que se da entre los receptores Trk y el receptor  $p75^{NTR}$  en respuesta a la unión de neurotrofinas; mientras que por otro lado se estudiaron las implicaciones putativas de



**Figura R-6: Las neurotrofinas modulan la colocalización de  $p75^{NTR}$  y CypB en PC12.** (A) Tinción inmunocitoquímica de células PC12 contra  $p75^{NTR}$  (verde) y CypB (rojo), tratadas con NGF o BDNF (100 ng/ml durante 10 min) en presencia o ausencia de CsA (5  $\mu$ M durante 1h). Tanto NGF como BDNF producen la internalización de  $p75^{NTR}$  pero sólo en ausencia de CsA. (B) Análisis de colocalización mediante coeficientes de Pearson's en el que se aprecia que la presencia de neurotrofinas provocaba un aumento significativo de la coincidencia entre ambos marcadores que puede ser revertida por la incorporación de CsA. Se muestran los datos (n = 5) como media  $\pm$  SD. (C) Valores absolutos de los coeficientes de colocalización de Pearson y R de Manders en función de los distintos tratamientos.

las ciclofilinas en las rutas de señalización de  $p75^{\text{NTR}}$  de manera independiente a los receptores Trk, tomando para ello distintos modelos fisiológicos previamente utilizados en el laboratorio, como son el proceso de formación de mielina en el SNP y la migración de las SCs. Ambos son procesos con una gran relevancia fisiopatológica y en los que está ampliamente caracterizada la participación de  $p75^{\text{NTR}}$ .

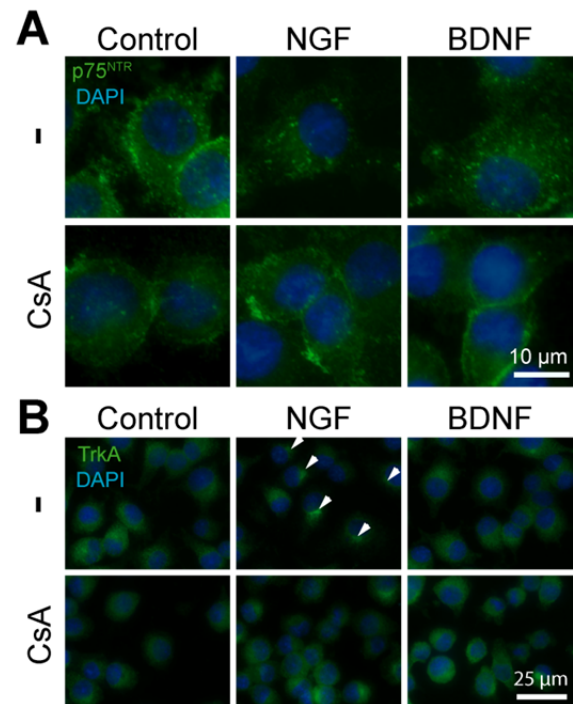
### 2.1. Acciones del bloqueo de CypB mediante CsA en la interacción $p75^{\text{NTR}}$ -Trk.

#### 2.1.1. El tratamiento con CsA reduce la internalización de receptores en respuesta a neurotrofinas.

Una parte integral de la respuesta de los receptores de neurotrofinas tras la unión de las mismas es su internalización, resultando un elemento esencial en su señalización. En neuronas, el receptor TrkA es rápidamente internalizado al unir NGF, tras lo cual va a ser dirigido hacia el soma por un mecanismo de transporte anterógrado formando unas estructuras que han sido denominadas como “signalosomas”. La unión de NGF a  $p75^{\text{NTR}}$  también va a producir una internalización del receptor, algo más lenta que la del complejo NGF-TrkA, y que dirige el receptor a endosomas tempranos, esenciales en la señalización de las neurotrofinas (Bronfman et al., 2003), a partir de los cuales se deriva hacia una ruta de reciclaje que los devuelve, así, a la membrana celular. Para determinar si la presencia de CsA producía algún efecto sobre dichas internalizaciones, se trataron células PC12 con neurotrofinas, en presencia o ausencia de pretratamientos con CsA, y se

determinó mediante tinciones inmunocitoquímicas la localización celular de los receptores.

De acuerdo con lo anteriormente descrito en la literatura, al tratar las células con NGF o con BDNF durante 10 min se pudo observar que se producía una deslocalización de  $p75^{\text{NTR}}$  de la



**Figura R-7: El tratamiento con CsA afecta a la internalización de receptores de neurotrofinas. (A)** Células PC12 pretratadas o no con 5  $\mu\text{M}$  de CsA durante 1h fueron tratadas con NGF o BDNF (100 ng/ml durante 10 min), analizándose la distribución de  $p75^{\text{NTR}}$  mediante inmunocitoquímica. La posición de los núcleos celulares se observó mediante tinción con DAPI (azul). En presencia de ambas neurotrofinas se observó una deslocalización de  $p75^{\text{NTR}}$  de la membrana, así como la aparición de acúmulos de internalización. Por el contrario, el pretratamiento con CsA previno en gran medida la internalización de  $p75^{\text{NTR}}$ . **(B)** Al utilizar un anticuerpo frente a TrkA se pudo comprobar que la adición de NGF en PC12 produjo también una internalización dicho receptor (señalado con flechas). De nuevo, en presencia de CsA se pudo apreciar una menor respuesta de internalización, equivalente a la observada en el control.



membrana plasmática, aumentando la presencia de acúmulos intracelulares de tamaño destacado. Sin embargo, un pretratamiento de dichas células durante 1h con CsA fue capaz de impedir la internalización de dicho receptor, eliminando de manera destacada la aparición de dichos acúmulos y manteniéndose la localización de p75<sup>NTR</sup> en la membrana celular, de forma similar a la observada en ausencia de neurotrofinas (FIG R-7A).

En el caso de la respuesta del receptor TrkA, como era de esperar, la adición de NGF, pero no de BDNF, provocaba una redistribución del mismo, observándose una mayor acumulación del mismo en la región perinuclear. De manera similar a lo ocurrido con p75<sup>NTR</sup>, el pretratamiento con CsA fue capaz de reducir destacadamente la respuesta de internalización, apreciándose un grado mucho menor de redistribución de TrkA, así como apenas presencia de su acumulación en la zona perinuclear (FIG R-7B).

Estos resultados permiten concluir que la presencia de CsA es capaz de impedir de manera destacada la internalización de ambos receptores de neurotrofinas, limitando su capacidad de señalización, lo cual concuerda con los datos obtenidos en experimentos anteriores de bloqueo de las ciclofilinas.

### 2.1.2. CsA reduce la activación del receptor TrkA en respuesta a NGF.

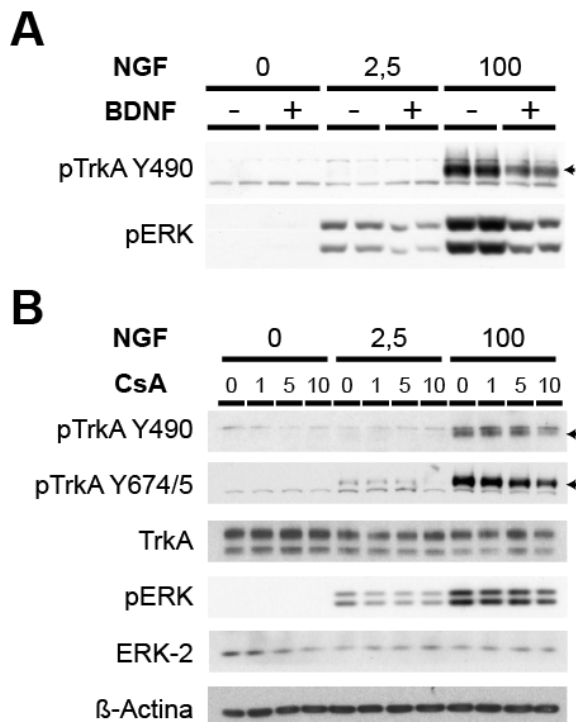
El receptor p75<sup>NTR</sup> es esencial para la obtención de una respuesta de alta afinidad en la unión de NGF a TrkA. Cuando se encuentran presentes ambos receptores, la unión de NGF provoca una potente

activación de TrkA mediante su autofosforilación, que se traduce intracelularmente en la activación de diferentes rutas, destacando la ruta de las MAPK donde se van a fosforilar entre otras las proteínas ERK 1 y 2. En ausencia de p75<sup>NTR</sup>, sin embargo, esta activación es mucho menor, obteniéndose respuestas mucho más débiles.

Este hecho puede ser fácilmente observado en un modelo experimental *in vitro*, como ocurre en el bloqueo bioquímico de p75<sup>NTR</sup> en células PC12 mediante la competición por la unión con diferentes neurotrofinas (Barker and Shooter, 1994). Aprovechando la capacidad de este receptor para unir a todas las neurotrofinas con igual afinidad, la adición de un exceso de BDNF (200 ng/ml), capaz de unirse a todas las moléculas de p75<sup>NTR</sup> e impedir por lo tanto la unión de NGF al mismo, se va a reflejar en una menor fosforilación de TrkA en respuesta a NGF, acompañada de la consiguiente disminución en la señalización mediada por este receptor, como queda demostrado por un menor nivel de fosforilación de MAPK (FIG R-8A). Este efecto puede apreciarse tanto en células tratadas con dosis subóptimas de NGF (2,5 ng/ml) como, incluso de forma más aparente, a dosis saturantes de NGF (100 ng/ml) en las que ya se ha alcanzado la respuesta máxima.

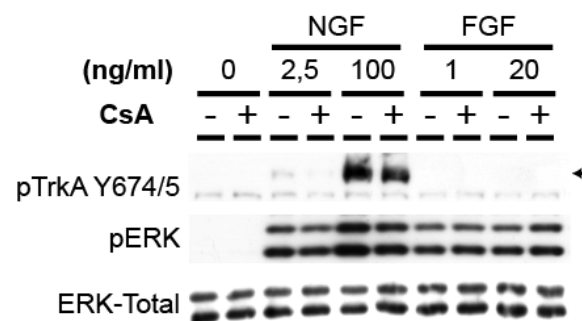
Para estudiar la posible intervención de las ciclofilinas en esta acción de p75<sup>NTR</sup>, se utilizaron células PC12, que expresan tanto el receptor p75<sup>NTR</sup> como TrkA. Estas células fueron inducidas con NGF, tanto a dosis bajas (2,5 ng/ml) como altas (100 ng/ml) durante 10 min, en presencia o ausencia de un pretratamiento de 1 h con CsA con el fin de bloquear la actividad de ciclofilinas. Se

utilizaron diferentes dosis de CsA, entre 1 y 10  $\mu$ M, todas dentro del rango habitual de uso de esta droga, tanto en su uso experimental como en el clínico. Para determinar el grado de activación se analizaron por WB los niveles de fosforilación de TrkA, así como los de ERK1/2, como lectura de las rutas de señalización intracelulares.



**Figura R-8: CsA inhibe la activación del receptor TrkA por NGF en células PC12.** (A) Células PC12 fueron tratadas con NGF (2,5 o 100 ng/ml) durante 10 min en presencia de un exceso de BDNF (200 ng/ml) y la activación de TrkA y ERK1/2 fue determinada por WB. El bloqueo competitivo de la unión de NGF a p75<sup>NTR</sup> produce una disminución tanto en la fosforilación de TrkA como en la de ERK1/2. (B) Células PC12 fueron tratadas con NGF (ng/ml) durante 10 min en presencia de diferentes dosis de CsA ( $\mu$ M), añadidas previamente durante 1h. El pretratamiento con CsA produjo una notoria disminución en la fosforilación de TrkA y ERK 1/2, de manera creciente en función de dosis, equivalente a la observada al bloquear la unión a p75<sup>NTR</sup> con BDNF. Los niveles totales de TrkA, ERK-2 y  $\beta$ -actina fueron determinados como controles de carga.

Cuando se bloquearon las ciclofilinas con CsA se pudo observar que la activación de TrkA fue notoriamente menor, produciéndose una inhibición de su fosforilación, de una manera creciente en función de la dosis (FIG R-8B). Este hecho se comprobó tanto al analizar la fosforilación de TrkA en la tirosina 490, esencial para el acoplamiento de proteínas adaptadoras como Shc, como también en el caso de la fosforilación de las tirosinas 674 y 675, pertenecientes al bucle regulador de autofosforilación de Trk. A una dosis de 5  $\mu$ M la cantidad de TrkA fosforilado observada se redujo aproximadamente a un 60% de la obtenida en condiciones control. Consecuentemente con esta menor autofosforilación de TrkA, al analizar el grado de activación de la ruta de las MAPK, comprobando la fosforilación de ERK1/2, se encontraron unos niveles de activación mucho menores a los observados en ausencia de CsA, con niveles de reducción de hasta un 45% a 10  $\mu$ M (FIG R-8B). De estos datos se puede concluir que CsA es capaz



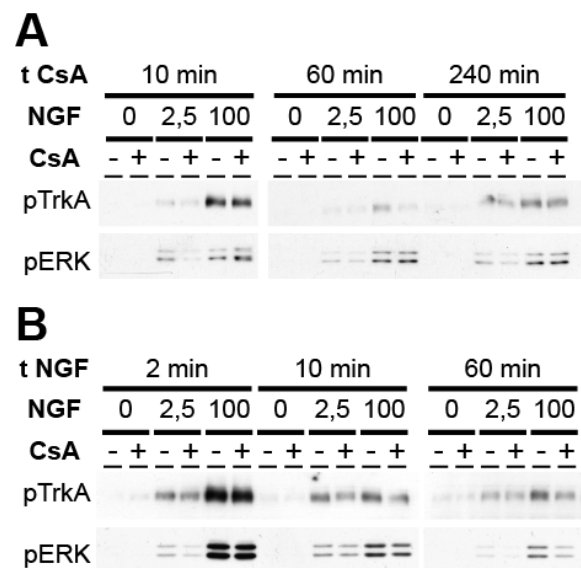
**Figura R-9: CsA no afecta a la inducción por FGF.** Células PC12 fueron inducidas bien con NGF o con FGF a las dosis señaladas durante 10 minutos, en presencia o ausencia de un pretratamiento con CsA a 5  $\mu$ M durante una hora. El pretratamiento de CsA no modificó la activación de ERK en respuesta a FGF, mientras que nuevamente fue capaz de inhibir tanto la fosforilación de TrkA como ERK en respuesta a NGF.

de inhibir la activación del receptor TrkA en respuesta a NGF, de una forma muy similar a la observado cuando se procede al bloqueo de la unión de NGF a p75<sup>NTR</sup> al incorporar un exceso de BDNF (FIG R-8A).

Con objeto de comprobar si este efecto de CsA era específico de la ruta de señalización de TrkA o si, por el contrario, se debía a una disminución generalizada de la señalización mediada por diferentes receptores tirosina quinasa, se procedió a analizar qué ocurría al incorporar un pretratamiento con CsA en la respuesta al tratamiento con FGF, otro factor de crecimiento al cual son capaces de responder la células PC12 y que comparte gran número de rutas de transducción de señales con TrkA, pero cuya respuesta no se encuentra modulada por la presencia y/o activación de p75<sup>NTR</sup>. El tratamiento con FGF produjo una fuerte inducción de la fosforilación de ERK, similar aunque ligeramente menor en intensidad a la obtenida con el tratamiento con NGF. En este caso, la preincubación de las células con CsA, que fue capaz de producir una fuerte disminución en la fosforilación de ERK en respuesta a NGF, no fue capaz de modificar el nivel de activación de la ruta ERK debido a la adición de FGF (FIG R-9). Estos resultados indicaron que el efecto de CsA es específico de la señalización mediada por TrkA y no es capaz de inhibir la respuesta de otros receptores de tipo tirosina quinasa.

Seguidamente, con objeto de caracterizar si la respuesta a CsA era un efecto rápido que pudiera ser indicativo de un efecto directo, se procedió a analizar el rango temporal de acción de la misma.

Con ese fin, células PC12 fueron pretratadas con CsA durante diferentes tiempos antes de ser inducidas con NGF, analizando el nivel de señalización mediada por esta neurotrofina nuevamente mediante el análisis de fosforilación de TrkA y de ERK1/2. La adición del agente inmunosupresor tan sólo 10 min antes de la inducción con NGF fue suficiente para producir la inhibición en la fosforilación de ERK. Esta acción de CsA se mostró persistente en el tiempo, puesto que la inhibición de la fosforilación de la ruta seguía estando presente en células pretratadas



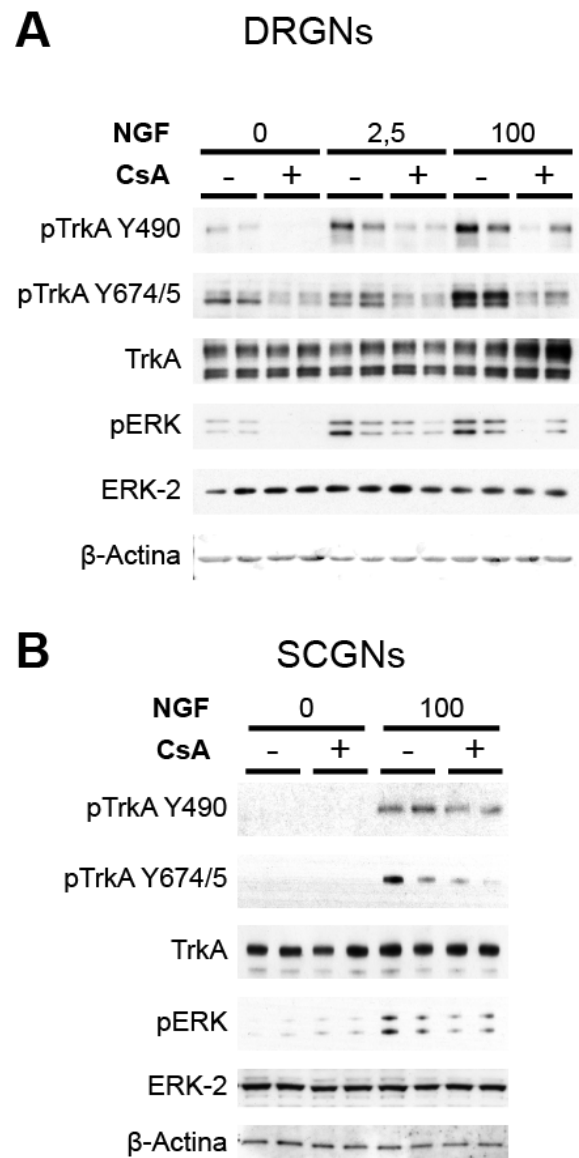
**Figura R-10: La inhibición mediada por CsA es sostenida en el tiempo. (A)** Células PC12 fueron tratadas con NGF (ng/ml) durante 10 min en presencia o ausencia de 5  $\mu$ M de CsA a diferentes tiempos, comprobando sus efectos sobre la activación de las rutas ERK. Los efectos inhibitorios de CsA se mantuvieron incluso a tiempos de pretratamiento tan prolongados como 4h. **(B)** Células PC12 fueron inducidas con NGF a diferentes tiempos en presencia o ausencia de un pretratamiento de 1h con CsA, y se comprobó el efecto producido sobre el nivel de activación de ERK. A tiempos de inducción de NGF de 1 h se siguió obteniendo una inhibición de pERK en presencia de CsA. Por tanto, la CsA va a estar afectando también a la respuesta sostenida de NGF sobre pERK.

hasta 4 h antes de la incorporación de NGF (FIG R-10A).

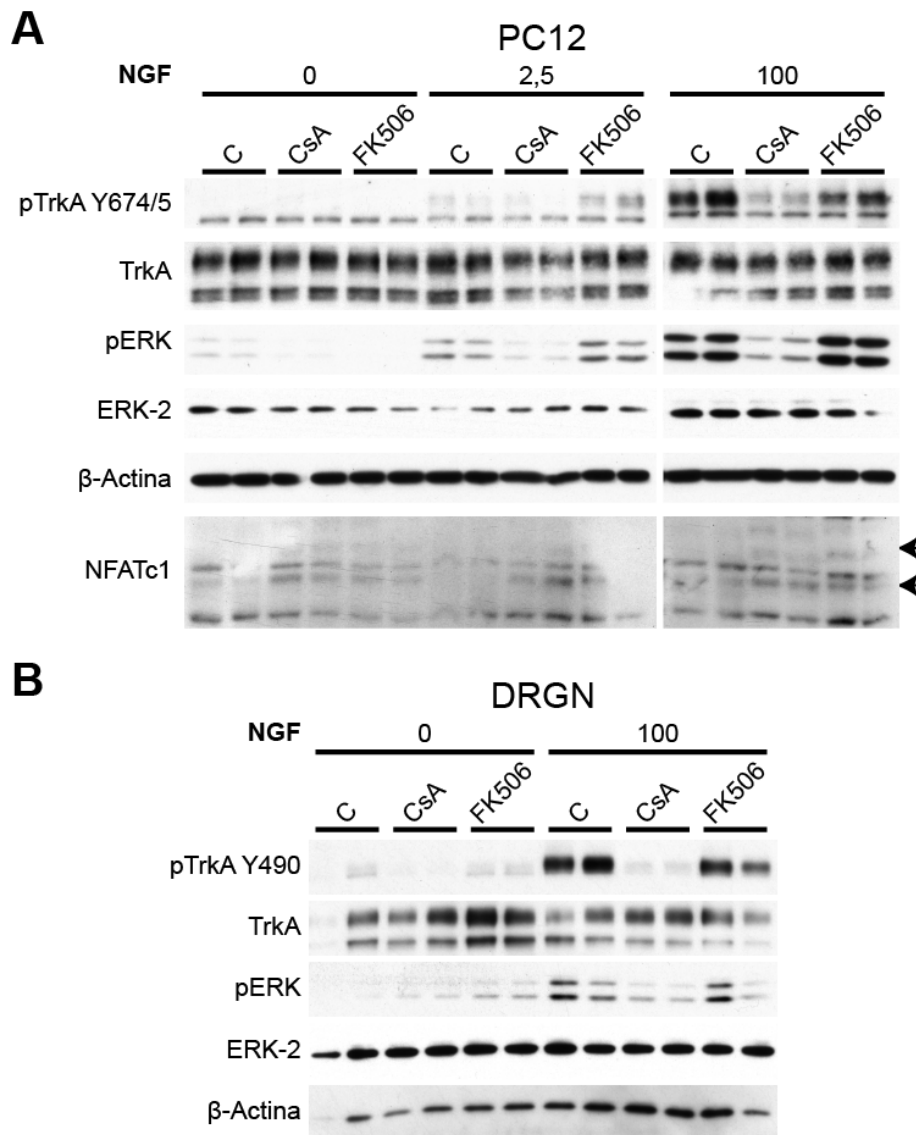
Como ya se ha descrito en el capítulo de Introducción, la activación de TrkA por NGF produce una activación rápida de las rutas MAPK, dependiente del acoplamiento de Ras (que es fundamentalmente la que ha sido analizada en los experimentos previos), pero genera también una segunda oleada de activación, más tardía y sostenida en el tiempo, que es dependiente del acoplamiento de Rap en endosomas. Con objeto de comprobar si esta segunda oleada de activación sostenida también se veía afectada por CsA, se reprodujeron los ensayos variando el tiempo de inducción por NGF. Cuando se trató con NGF durante 1h, tiempo suficiente para estar desencadenando respuestas vía Rap, se pudo comprobar que la presencia de CsA también era capaz de inhibir la fosforilación de ERK1/2 (FIG R-10B).

Aunque las células PC12 son el modelo típico para el estudio de la respuesta al tratamiento con NGF, se reprodujeron los experimentos de inducción con NGF utilizando cultivos primarios, más próximos a las condiciones fisiológicas, procedentes tanto de DRGs (neuronas sensoriales) como de SCGs (neuronas simpáticas), en ambos casos de rata. Ambos tipos de neuronas expresan tanto p75<sup>NTR</sup> como TrkA, siendo las neuronas SCG el tipo neuronal más próximo a las células PC12. Dichas neuronas son dependientes para su mantenimiento de NGF, que ha de suministrarse en el cultivo para garantizar su supervivencia. Con objeto de poder observar adecuadamente la inducción de TrkA, el NGF fue retirado 4 h antes de la realización de los

experimentos, tiempo suficiente para lograr disminuir los niveles basales de activación de



**Figura R-11: CsA inhibe la respuesta a NGF en cultivos de neuronas primarias.** Cultivos primarios de neuronas procedentes de (A) DRG o (B) SCG fueron incubados con NGF (a las concentraciones en ng/ml indicadas en la figura) durante 10 min en combinación o no con 1 h de pretratamiento con 5  $\mu$ M de CsA, analizándose por WB los niveles de activación del receptor TrkA, así como la inducción de la ruta ERK. De igual manera a lo observado en PC12, el tratamiento con CsA redujo de manera notoria la activación del receptor TrkA en respuesta a NGF, así como la fosforilación concomitante de ERK.



**Figura R-12: Los efectos de CsA sobre la activación de TrkA son dependientes de ciclofilinas e independientes de calcineurina. (A)** Células PC12 o **(B)** Cultivos primarios de DRGN fueron tratados con distintas dosis de NGF durante 10 min, en combinación con pretratamientos con CsA o con FK506 (ambos durante 1h a 5  $\mu$ M) y se comprobaron mediante WB los niveles de fosforilación de TrkA y ERK. La adición de FK506 no produjo modificaciones sobre los niveles de activación de la ruta, a diferencia de lo ocurrido al añadir CsA. Como control de la acción farmacológica de ambas drogas se determinó el estado de NFATc1 en células PC12, que permitió comprobar que la inhibición de calcineurina era máxima con ambos fármacos (por presencia de banda de hiperfosforilación, señalada con la punta de flecha).

TrkA sin desencadenar respuestas apoptóticas. En ambos casos, dadas las limitaciones metodológicas del modelo, se utilizó solamente una dosis de 5  $\mu$ M de CsA, suficiente para provocar un efecto inhibitorio destacado en PC12. Los resultados obtenidos en neuronas primarias no solo reprodujeron la menor activación de TrkA y ERK

en respuesta a NGF al pretratar durante 1h con CsA, sino que además, el efecto producido fue todavía más pronunciado que el observado en PC12, llegando a obtener disminuciones de la fosforilación de TrkA y ERK1/2 de hasta un 50% y un 70% respectivamente (FIG R-11).

### 2.1.3. Los efectos de CsA sobre la activación de TrkA son independientes de calcineurina.

El principal mecanismo de acción descrito para las ciclofilinas es el que está relacionado con la inhibición de la fosfatasa calcineurina, responsable de sus acciones inmunosupresoras. Con objeto de comprobar la posible implicación de dichos mecanismos en la inhibición que se observaba sobre la fosforilación de TrkA, se utilizó la droga inmunosupresora FK506, que es capaz de bloquear la actividad de las FKBP. Esta familia de inmunofilinas presenta la misma actividad enzimática que las ciclofilinas y también producen, al unirse a FK506, inhibición de calcineurina. Por ello, si la inhibición de calcineurina fuese el mecanismo implicado en los efectos de CsA sobre la activación de TrkA, el tratamiento con este otro agente inmunosupresor habría de producir un efecto equivalente a la inhibición de las ciclofilinas.

Para comparar el efecto de ambos tipos de inmunofilinas, cultivos de células PC12 se pretrataron durante 1h con CsA o FK506, ambos a una concentración de 5  $\mu$ M, para posteriormente tratar durante los 10 min finales con NGF. Al analizar los niveles de activación de la ruta de TrkA se pudo apreciar que, a diferencia del bloqueo en la inducción de pTrk y de pERK observado al pretratar con CsA, el pretratamiento con FK506 no fue suficiente para provocar reducciones significativas sobre los niveles de fosforilación de TrkA o ERK (FIG R-12A).

Estos resultados fueron nuevamente confirmados en neuronas primarias procedentes de DRGs, en

las que el pretratamiento con FK506 no produjo ningún efecto significativo sobre la inducibilidad por NGF de pTrkA y pERK, a diferencia de la fuerte disminución del mismo en el caso de los pretratamientos con CsA, que es incluso mayor que la observada en células PC12 (FIG R-12B).

Esta falta de efectividad de FK506 podría deberse a que, efectivamente, el bloqueo de la actividad de calcineurina no fuese relevante en el fenómeno analizado o, por el contrario, a una menor efectividad de esta droga sobre la actividad de calcineurina en los tipos celulares o condiciones utilizadas, en contraposición a CsA. Con objeto de descartar esta posibilidad, se procedió a determinar el grado de inhibición de calcineurina, analizando el grado de fosforilación del factor de transcripción NFAT, una de las dianas principales de la fosfatasa calcineurina. En condiciones normales, dicho factor es defosforilado por calcineurina, lo que es esencial para su entrada al núcleo y su intervención en la transcripción génica. Sin embargo, cuando se inhibe la calcineurina queda en estado hiperfosforilado, reconocible por su diferente movilidad electroforética en gel, desencadenando así las acciones inmunosupresoras asociadas a CsA y FK506. Los diferentes NFAT presentaron unos niveles bajos de expresión en células PC12, dificultando su detección por WB. NFATc1, el que mejor nivel de detección mostró, presentó un patrón complejo de isoformas con movilidad variada, como ya ha sido descrito en otros tipos celulares (Timmerman et al., 1997) y en células PC12 (Cano et al., 2005), lo que hace más complejo el análisis de los resultados. En cualquier caso, en condiciones basales se pudo apreciar un patrón de bandas que se ve modificado sólo



parcialmente tras el tratamiento con NGF (FIG R-12A), como cabría esperar dado el modesto efecto de esta neurotrofina sobre la actividad de NFAT (Groth et al., 2007). El pretratamiento con CsA, tanto en células control como tratadas con NGF, produjo un incremento en la intensidad de algunas de las bandas de NFATc1, que pueden ser asimiladas a NFATc1 hiperfosforilado. Asimismo, en presencia de FK506 se apreció el mismo resultado que en el tratamiento con CsA, lo cual no correlaciona con la inhibición de la actividad de TrkA (FIG R-12A). De esta manera, se puede concluir que la acción de CsA sobre la actividad de TrkA era independiente de la inhibición de calcineurina y que, además, la interacción funcional con la señalización neurotrófica es específica de ciclofilinas y no parecen intervenir en ella las rutas compartidas entre ciclofilinas y FKBP.

#### **2.1.4. CypB es necesaria para las acciones de CsA sobre la señalización NGF-TrkA.**

Con el fin de confirmar que CypB era la ciclofilina responsable de los efectos de CsA sobre la señalización Trk-dependiente de  $p75^{\text{NTR}}$ , se procedió a analizar el efecto de dicho agente inmunosupresor en su ausencia. Para ello se emplearon células PC12 en las que se disminuyeron los niveles de proteína de CypB mediante el uso de técnicas de interferencia de ARN. Debido a los elevados niveles de expresión de CypB se utilizaron plásmidos que expresaban shRNAs, en lugar de recurrir a siRNAs, con el fin de maximizar la inhibición, tanto en el tiempo como en intensidad. Con este fin, se generaron diferentes plásmidos capaces de expresar pequeños

ARNs en horquilla, dirigidos a eliminar el ARN mensajero de CypB de manera específica utilizando las maquinarias de silenciamiento celular.

Una vez comprobado que la expresión de los plásmidos generados era efectivamente capaz de reducir los niveles de CypB de manera satisfactoria, sin afectar a los niveles de proteína de CypA, se procedió a transfectar células PC12 con los mismos. Tras 7 días, tiempo necesario para alcanzar un máximo de inhibición de los niveles de proteína de CypB, las células fueron pretratadas con 5  $\mu\text{M}$  de CsA durante 1h o con el vehículo correspondiente, antes de proceder a la inducción con 100 ng/ml de NGF durante 10 min de la manera habitual en los experimentos anteriores. Posteriormente, se analizaron mediante WB los niveles de fosforilación de TrkA y de ERK, así como los niveles de CypB como comprobación de un nivel adecuado de disminución. En aquellas células en las que se había producido la interferencia sobre CypB, el pretratamiento con CsA no fue capaz de inhibir los niveles de inducción de la ruta de TrkA en respuesta a NGF, obteniendo unos niveles de fosforilación de TrkA equivalentes a los obtenidos en situación control. De igual manera, la fosforilación de ERK1/2 en presencia de CsA en células donde CypB estaba disminuida fue equivalente a la encontrada en ausencia del inmunosupresor. Esta pérdida del efecto de CsA no se debe a un efecto inespecífico debido a la sobreexpresión de un shRNA, ya que no pudo ser observada cuando se utilizó un shRNA “scramble”, generado por la permutación aleatoria de uno de los shRNAs usados, donde nuevamente se detectó una menor activación de la ruta de TrkA

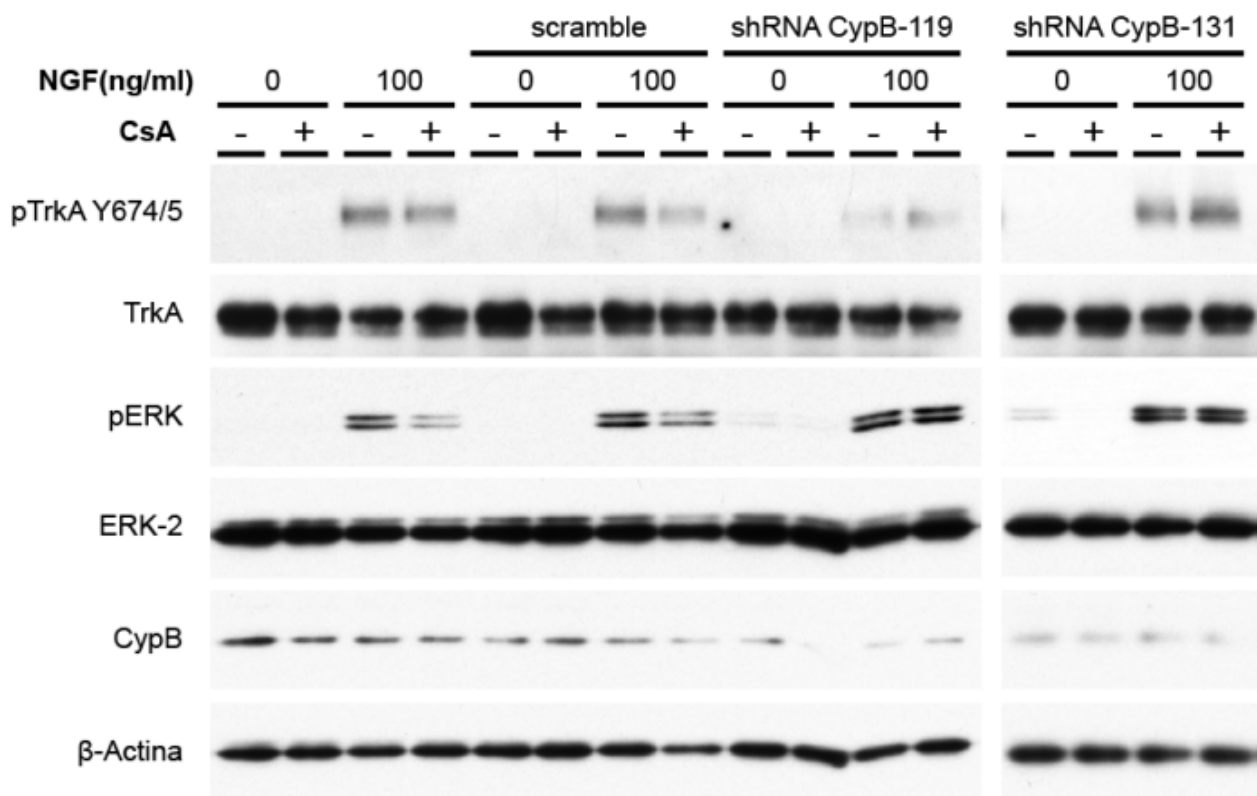
cuando se pretrató con CsA (FIG R-13). Estos resultados evidencian que CsA produce una disminución sobre la activación de TrkA por NGF mediante un mecanismo que es dependiente de CypB, puesto que en su ausencia no se observa acción alguna de CsA.

### 2.1.5. p75<sup>NTR</sup> también es necesario en la acción inhibitoria de CsA sobre la activación de TrkA.

Tras caracterizar la intervención de CypB en las acciones de CsA, se quiso confirmar además que este fenómeno se debía a la pérdida del efecto positivo de p75<sup>NTR</sup> sobre la señalización vía TrkA, como demostración de la interacción funcional

entre ambos elementos. Para ello se utilizaron dos modelos distintos.

En primera instancia, se utilizó un modelo heterólogo mediante la comparación de líneas celulares derivadas de NIH-3T3 que expresan de manera estable sólo TrkA (MG87-TrkA) o TrkA en combinación con p75<sup>NTR</sup> (MG87-TrkA/p75) (FIG R-14A). Estas células fueron inducidas de la forma habitual con NGF para comprobar los niveles de activación de TrkA y de las rutas ERK, tanto en ausencia como en presencia del pretratamiento con CsA para comprobar su efecto sobre dicha activación. En las células MG87-TrkA/p75, que expresan ambos receptores, el



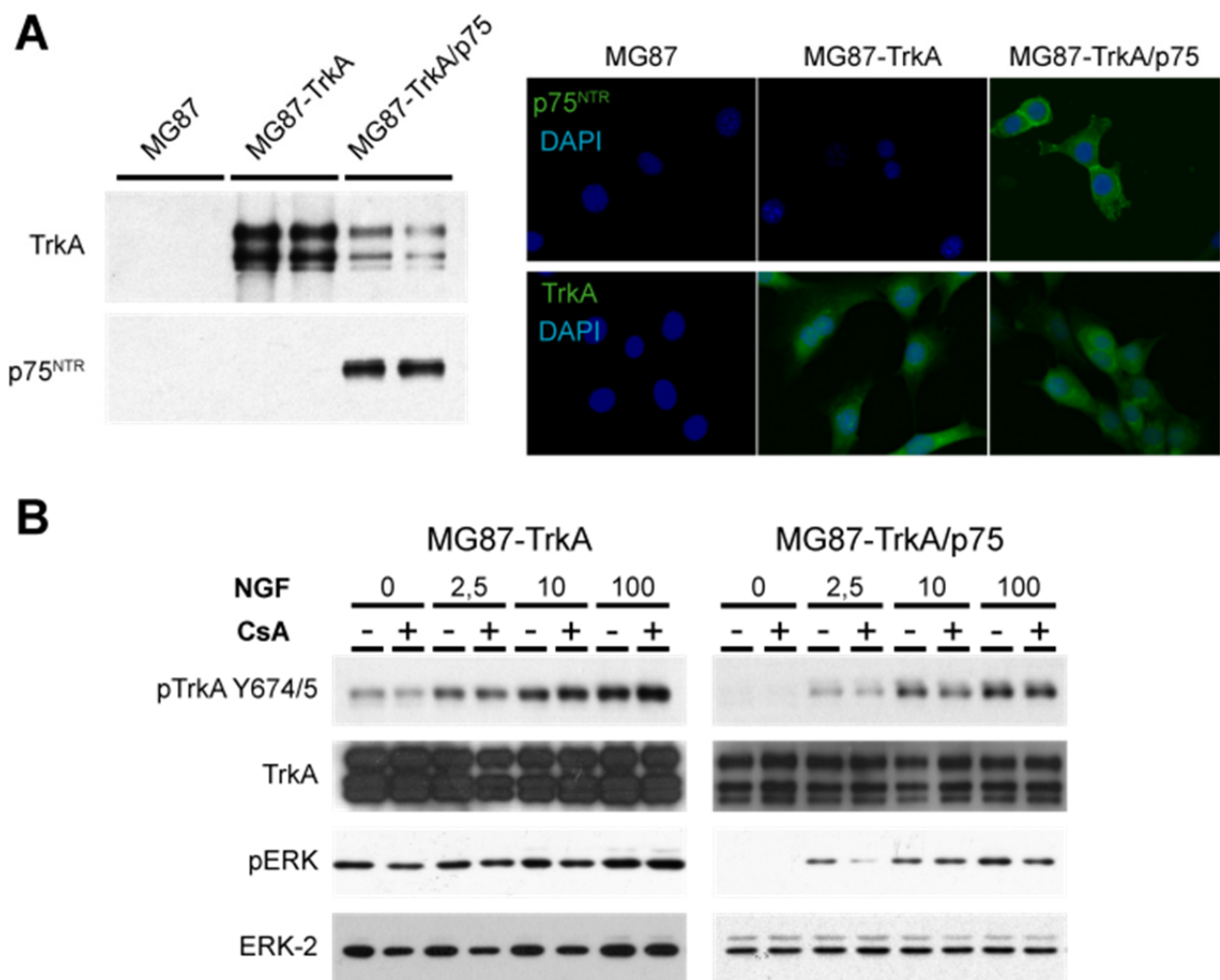
**Figura R-13: CypB es necesaria en los efectos mediados por CsA.** Células PC12 fueron transfectadas con vectores para la expresión de shRNAs específicos de CypB o un shRNA “scramble”. Transcurridos 7 días fueron pretratadas o no con 5  $\mu$ M CsA durante 1 h y tratadas con 100 ng/ml de NGF durante 10 min, analizándose por WB los niveles de pTrkA y pERK. La disminución en los niveles de CypB (comprobado por WB) previno el efecto inhibitorio de CsA sobre la inducción de pTrk y pERK.



comportamiento fue el mismo que el observado en células PC12, con un fuerte aumento en la fosforilación de TrkA y ERK en respuesta a NGF, y la correspondiente menor activación de los mismos al bloquear las ciclofilinas mediante CsA. Sin embargo, en las células MG87-TrkA, en ausencia de  $p75^{\text{NTR}}$ , la fosforilación de TrkA y ERK no fue menor al pretratar durante 1h con CsA, quedando unos niveles de inducción

equivalentes a los observados en la condición control (FIG R-14B).

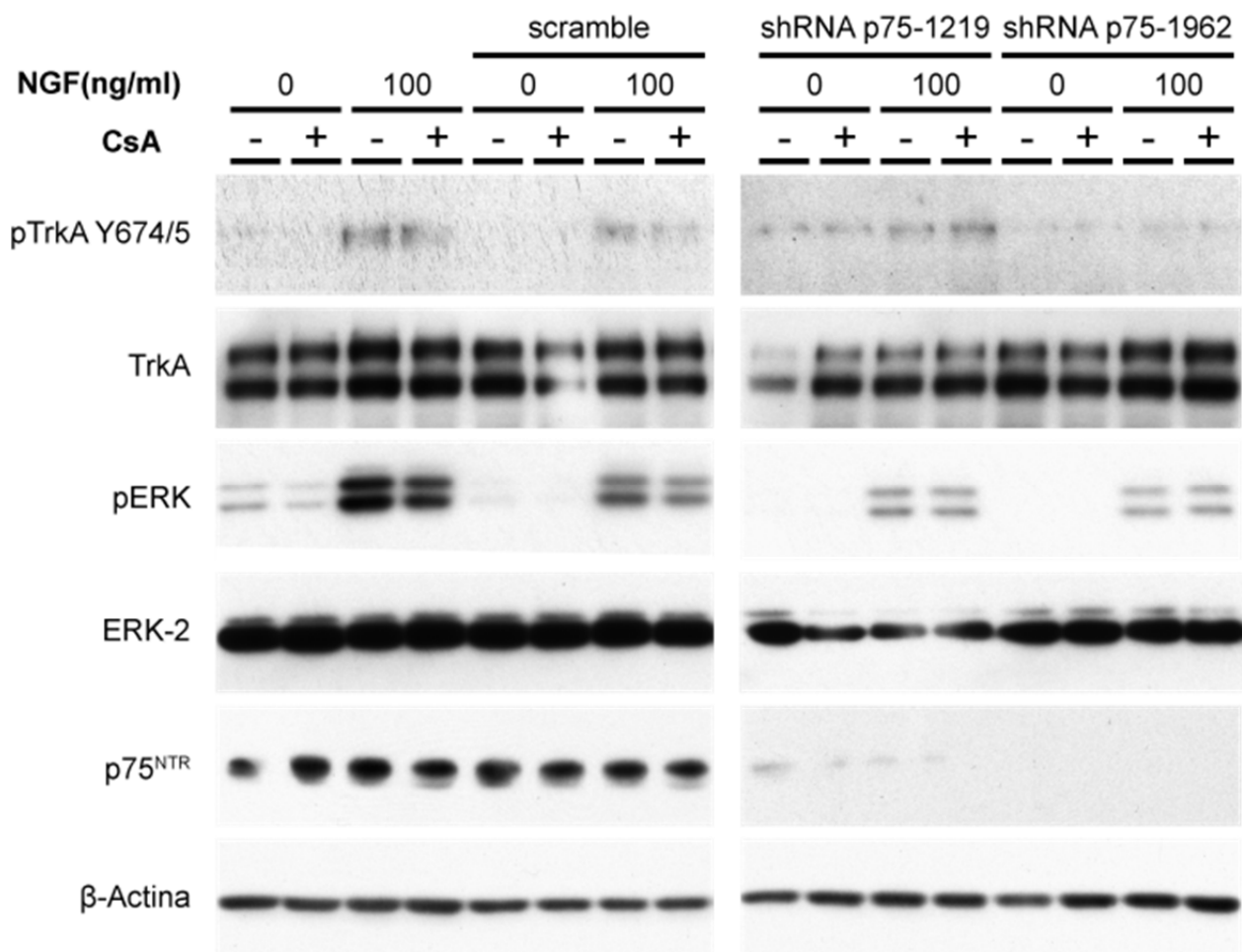
Un problema inherente al uso de modelos heterólogos que sobreexpresan altas cantidades de TrkA es el alto nivel de autofosforilación de dicho receptor y la poca inducibilidad residual por NGF en ausencia de  $p75^{\text{NTR}}$ , lo que podría enmascarar los efectos de CsA. Para una comprobación más



**Figura R-14:  $p75^{\text{NTR}}$  es necesario en el bloqueo de la ruta Trk mediado por CsA: Modelos heterólogos.** Células MG87 expresando TrkA o TrkA y  $p75^{\text{NTR}}$ . (A) Determinación por WB e inmunofluorescencia de la presencia de los receptores TrkA y  $p75^{\text{NTR}}$  en las distintas líneas utilizadas. (B) Dichas células fueron tratadas con distintas dosis de NGF (10 min), en presencia o ausencia de pretratamiento con 5  $\mu\text{M}$  de CsA durante 1h. En las células que expresan  $p75^{\text{NTR}}$  (MG87-TrkA/p75) el nivel de fosforilación de TrkA o ERK en presencia de CsA fue notoriamente menor que en ausencia del tratamiento, reproduciendo el efecto observado en células PC12 o neuronas DRG. Sin embargo, en ausencia de  $p75^{\text{NTR}}$  (células MG87-TrkA), el pretratamiento con CsA no fue capaz de disminuir la fosforilación de TrkA o ERK 1/2 debida a la inducción con NGF.

exhaustiva, se llevó a cabo un silenciamiento de p75<sup>NTR</sup> en células PC12, utilizando de nuevo vectores para la expresión de shRNAs. En este caso se recurrió a una transfección estable, con el fin de lograr un mayor silenciamiento de la proteína. Una vez puesta a punto la interferencia de p75<sup>NTR</sup>, se realizaron experimentos de inducción por NGF en ausencia o presencia de pretratamiento con CsA, de la forma habitual. Conforme a lo esperado, en condiciones de silenciamiento de p75<sup>NTR</sup> se obtuvieron menores niveles de activación de TrkA al añadir NGF, dado el efecto positivo que tiene sobre dicha inducción

la presencia del mismo. Por otro lado, se pudo comprobar que el pretratamiento con CsA no provocó ninguna modificación en los niveles de fosforilación de TrkA ni en los de ERK, al comparar con la ausencia del mismo (FIG R-15). Estos resultados demuestran que la presencia de p75<sup>NTR</sup> es esencial para la acción mediada por la CsA en la respuesta de inducción por NGF, determinando que, de alguna manera, el bloqueo de CypB afecta a la colaboración entre ambos receptores respecto a la respuesta a esta neurotrofina.



**Figura R-15: p75<sup>NTR</sup> es necesaria en el bloqueo de la ruta Trk mediado por CsA: Silenciamiento de RNA.** Células PC12 transfectadas establemente con vectores para la expresión de shRNAs específicos de p75<sup>NTR</sup> o un shRNA “scramble” fueron pretratadas o no con 5  $\mu$ M de CsA durante 1 h y tratadas con 100 ng/ml de NGF durante los últimos 10 min, determinándose los niveles de pTrkA y pERK mediante WB. La reducción de los niveles de p75<sup>NTR</sup> impide el efecto inhibitorio de CsA sobre la estimulación de Trk y ERK en respuesta a NGF.

### **2.2. El bloqueo de CypB inhibe respuestas de p75<sup>NTR</sup> independientes de Trk.**

Ya ha sido anteriormente mencionado que, de manera independiente a los receptores Trk, la unión de neurotrofinas a p75<sup>NTR</sup> también es capaz de producir una serie de respuestas, siempre asociadas a la participación de elementos intracelulares que se unen a este receptor. Con el fin de investigar si este tipo de respuestas también se veían moduladas por CypB se procedió a su análisis utilizando distintas aproximaciones experimentales.

#### **2.2.1. El bloqueo de CypB inhibe la mielinización periférica.**

El receptor p75<sup>NTR</sup> es un importante regulador del proceso de formación de mielina en el SNP (Cosgaya et al., 2002), en un mecanismo dependiente de BDNF y en el que intervienen tanto las neuronas como las SCs. Dada la importancia fisiológica de dicho proceso, y la relevancia de la señal neurotrófica en su fisiopatología, se quiso estudiar qué posible implicación tenía la interacción entre p75<sup>NTR</sup> y CypB en dicho proceso.

##### **2.2.1.1. CsA es un potente inhibidor del proceso de mielinización periférica.**

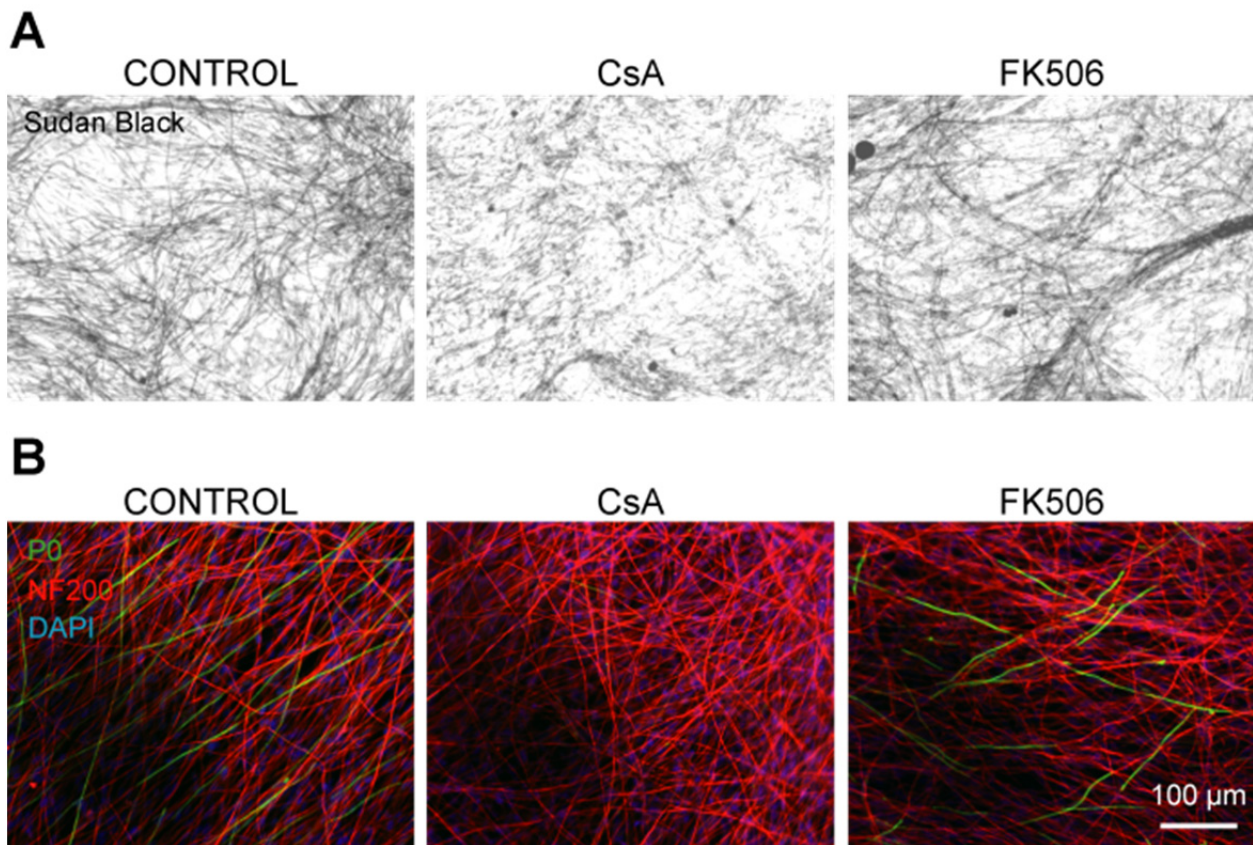
Para el análisis de la posible implicación de CypB en el proceso de mielinización periférica se utilizó como modelo *in vitro* el sistema de cocultivos mielinizantes de neuronas sensoriales con SCs. En este modelo primero se procede a establecer el cultivo de neuronas, tras lo cual se incorporan las

SCs, que se dejan proliferar y colocarse sobre los axones. A partir de este punto, la formación de mielina requiere de la adición de ácido ascórbico, esencial en la formación de la lámina basal, y sin el cual no se da lugar al proceso. Ello nos permite estudiar el proceso de mielinización *per se*, al haberse dado hasta cierto punto una sincronización de las SCs. Cualquier elemento a estudio que sea añadido concomitantemente con el ácido ascórbico afectará esencialmente al proceso de mielinización, descartando en mayor medida su posible acción sobre otros procesos como la proliferación o migración de las SCs, o el establecimiento de la interacción SC-axón, puesto que ya han ocurrido de forma previa. En la formación de mielina en el sistema nervioso periférico BDNF ejerce un papel regulador esencial, siendo secretado de manera endógena por las neuronas sensoriales (Ng et al., 2007) y modulando el proceso de manera positiva a través de p75<sup>NTR</sup> (Cosgaya et al., 2002). Con objeto de comprobar si el bloqueo de la acción de las ciclofilinas era capaz de tener efectos sobre este modelo de actuación de p75<sup>NTR</sup>, cocultivos mielinizantes fueron tratados con CsA durante el tiempo que dura el proceso de formación de la mielina, a lo largo de entre 7 y 10 días. Transcurrido este tiempo, se procedió a la evaluación del grado de mielinización alcanzado mediante diferentes técnicas analíticas.

En primera instancia, se determinó que la adición de CsA producía una potente inhibición de la formación de mielina, lo que se pudo observar a gran escala mediante una tinción de lípidos utilizando el colorante negro Sudán. Utilizando esta técnica se puede distinguir claramente la mielina, por su mayor densidad de envueltas lipídicas, que va a generar un mayor contraste. Este método de tinción nos permitió determinar que existía una drástica disminución en el número de internodos de mielina en presencia de 5  $\mu$ M de CsA. Con el fin de comprobar si, de manera similar a las inhibiciones observadas sobre la

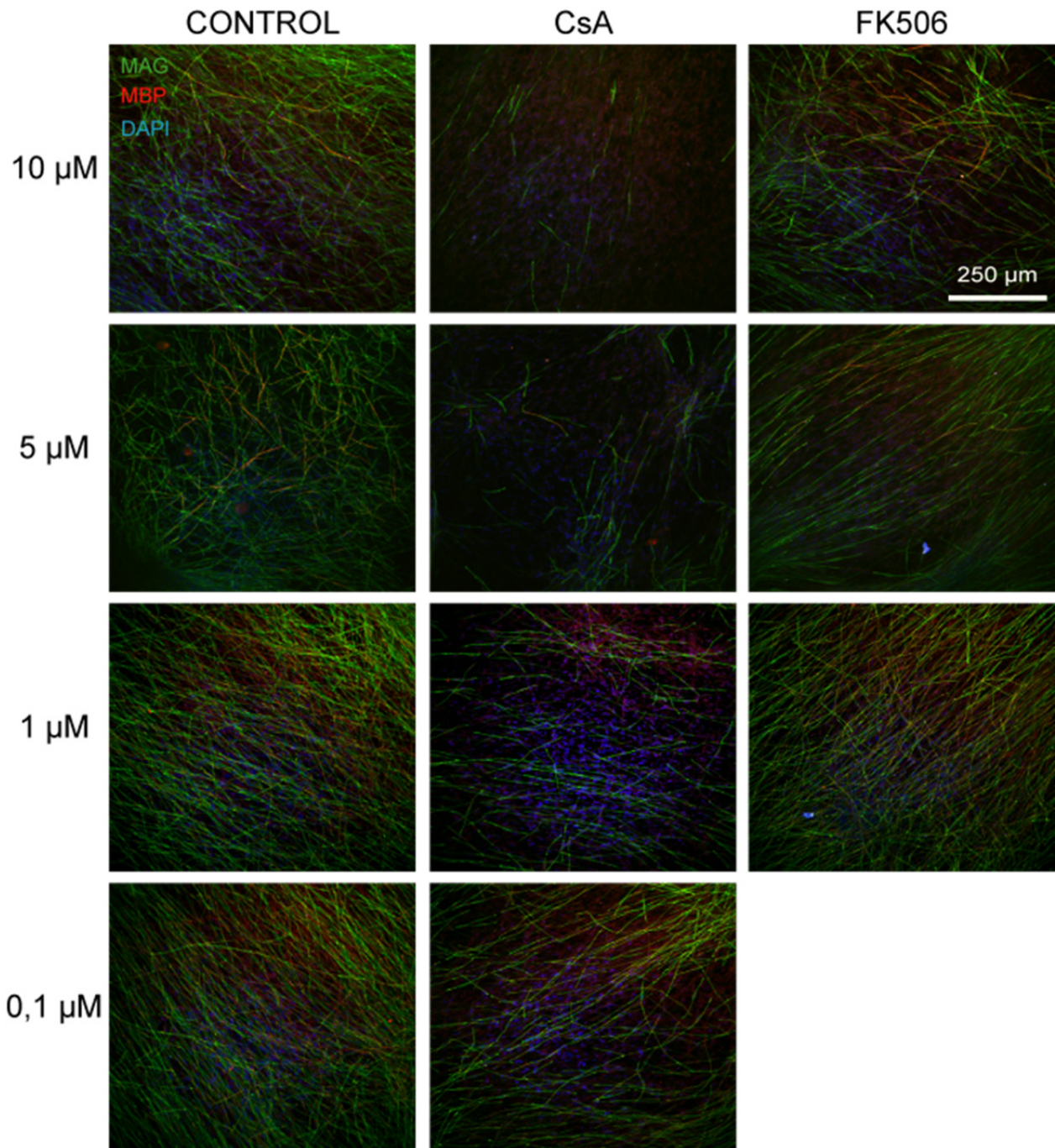
inducción de TrkA, los efectos sobre mielina eran o no específicos de ciclofilinas, se realizaron cocultivos mielinizantes de manera paralela en presencia de FK506, con el fin de bloquear FKBP. En este caso, la presencia de la droga inmunosupresora tuvo tan solo un ligero efecto, obteniendo cocultivos con un grado de mielinización similar al observado en condiciones control (FIG R-16A).

Con objeto de determinar de una manera más precisa qué estaba ocurriendo con el proceso de mielinización, se procedió a analizar la



**Figura R-16: CsA es un potente inhibidor de la formación de mielina periférica.** Cocultivos de DRGNs con SCs fueron inducidos para la formación de mielina mediante la adición de ácido ascórbico durante 7 días, en presencia de 5  $\mu$ M de CsA o FK506. **(A)** Imágenes de microscopía de campo claro de tinciones con negro Sudán, marcador de lípidos de membranas celulares. Se pudo observar un menor número de internodos de mielina en presencia de CsA, observándose solo una ligera disminución respecto al control en cocultivos tratados con FK506. **(B)** Imágenes de microscopía convencional de fluorescencia, usando anticuerpos contra la proteína de mielina p0 y neurofilamento axonal. La red de axones no se vio afectada en ninguna de las condiciones estudiadas, mientras que nuevamente se pudo observar el efecto inhibitorio de CsA sobre la mielina, al disminuir drásticamente el número de internodos positivos para p0.





**Figura R-17: CsA inhibe la mielinización periférica de forma dosis dependiente.** Cocultivos mielinizantes de DRGNs con SCs fueron mantenidos en presencia o ausencia de CsA o FK506 a las dosis indicadas durante 10 días tras la inducción con ácido ascórbico del proceso de mielinización y el grado de mielinización fue determinado mediante microscopía inmunofluorescencia. Proyecciones bidimensionales en el eje Z de las imágenes de microscopía confocal mostrando tinciones con anticuerpos frente a MAG (verde) y MBP (rojo). Los núcleos celulares se visualizaron mediante tinción con DAPI. En presencia de CsA se apreció una importante reducción del número de internodos de mielina, de manera creciente en función de la dosis utilizada. En cambio, en presencia de FK506 se produjo solo una ligera disminución en el número de internodos, similar en todas las dosis empleadas.

acumulación y distribución de la principal proteína marcadora de mielina, p0. Mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas se pudo

comprobar que en presencia de CsA la aparición de p0 en los internodos de mielina estaba fuertemente inhibida, mientras que al incorporar

FK506 apenas había diferencias con la situación control, encontrando niveles muy similares de dicha proteína de mielina (FIG R-14B). Queriendo descartar que la inhibición de la mielinización fuese un evento secundario ocasionado por un efecto deletéreo de CsA sobre la integridad o viabilidad de los cultivos, se analizó la integridad de la red axonal mediante su visualización por tinción inmunocitoquímica frente a la cadena pesada de neurofilamento (NF200), un marcador típico de integridad de los axones. En ninguno de los casos estudiados, ni al mantener los cocultivos en presencia de CsA ni de FK506 se pudieron observar daños a la estructura de la red axonal. Tampoco se pudieron observar diferencias en el número o viabilidad de SCs presentes en los cultivos, no apreciándose diferencias aparentes en el número total de núcleos visualizados mediante tinción con DAPI, o en la proporción de células apoptóticas, que fue muy baja en todos los casos analizados (FIG R-16B).

Para analizar en más detalle el efecto inhibitorio de CsA sobre la formación de mielina, se pasó a estudiar la acumulación de distintas proteínas marcadoras de diferentes etapas del proceso de mielinización, como son MAG y MBP, mediante tinciones inmunocitoquímicas. Asimismo, ya que la inhibición de los efectos Trk-dependientes de p75<sup>NTR</sup> era altamente dependiente de dosis, se utilizaron distintas concentraciones de CsA y FK506 para comprobar su influencia sobre el proceso de mielinización. Como era de esperar, el análisis de MBP, un buen marcador de mielina compacta, reveló un resultado muy similar al obtenido con p0 (también un marcador tardío de mielina compacta), apreciándose una fuerte

inhibición del proceso de mielinización. Como ocurría en los estudios de activación de TrkA, este efecto es dosis-dependiente. A dosis relativamente bajas (0,1 ó 1  $\mu$ M), CsA produjo un efecto moderado aunque claramente apreciable sobre la formación de mielina, llegando a producir una inhibición prácticamente completa a dosis más altas (5 ó 10  $\mu$ M). Por el contrario, FK506 fue capaz tan sólo de producir una modesta disminución en la cantidad total de mielina madura, con una potencia prácticamente similar en todas las dosis analizadas (FIG R-17).

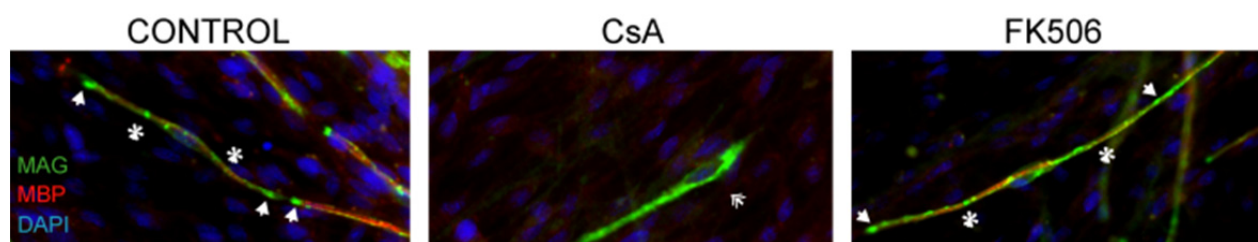
Estos resultados indicaron que el bloqueo de ciclofilinas mediante CsA era capaz de producir una drástica inhibición del proceso de mielinización periférica, reduciendo drásticamente el número de internodos maduros de una manera dependiente de dosis.

### **2.2.1.2. CsA retrasa la maduración de los internodos de mielina en el SNP.**

Cuando se analizaron las etapas iniciales de la formación de la vaina de mielina, mediante el uso de un marcador temprano que se encuentra localizado esencialmente en las estructuras no compactas de la mielina, como es MAG, el resultado obtenido fue similar al encontrado para las proteínas tardías como MBP o p0: CsA produjo una fuerte inhibición dosis-dependiente en el número de internodos inmaduros observados, mientras que FK506 tuvo tan sólo un ligero efecto similar al apreciado en etapas más tardías del proceso, independientemente de la dosis usada (FIG R-17).

Además de reducir el número total de internodos de mielina, se pudo comprobar que la adición de CsA a los cocultivos produjo un destacado retraso en la maduración de los escasos internodos que aparecen. Esto quedó de manifiesto al analizar la distribución de las proteínas MAG y MBP en dichos internodos. En un internodo maduro, MBP se va a localizar en las regiones de mielina compacta, mientras que MAG, que inicialmente se distribuye por toda la longitud del internodo, queda finalmente relegada a las regiones no compactas: zonas paranodales e incisuras de Schmidt-Lanterman. Esta distribución característica pudo ser observada mediante tinciones inmunocitoquímicas en cocultivos tras 10 días de formación de mielina en condiciones control. En dosis bajas ( $0,1 \mu\text{M}$ ) de CsA, así como en los distintos tratamientos con FK506, a pesar de la ligera reducción en el número de internodos, el grado de maduración de los mismos se mostró normal, con la distribución de proteínas característica de las condiciones control (FIG R-

17). Sin embargo, los tratamientos con dosis crecientes de CsA durante la formación de mielina, además de provocar la aparición de un menor número de internodos con un tamaño notoriamente inferior, afectaron de manera clara a la maduración de los mismos. En dichos internodos se encontró una distribución de MAG a lo largo de toda su longitud y, además, apenas se pudo observar presencia de MBP, indicando la práctica inexistencia de mielina compacta. Esta distribución típicamente inmadura solo pudo ser apreciada en presencia del tratamiento con CsA, y no pudo ser encontrada en los cocultivos que se mantuvieron en presencia de FK506, donde la distribución que se obtuvo fue la misma que la observada en condiciones control, independientemente de la dosis utilizada (FIG R-18). Por tanto, el tratamiento con dosis altas de CsA, pero no así de FK506, produjo un notorio retraso en la maduración de los escasos internodos de mielina encontrados.

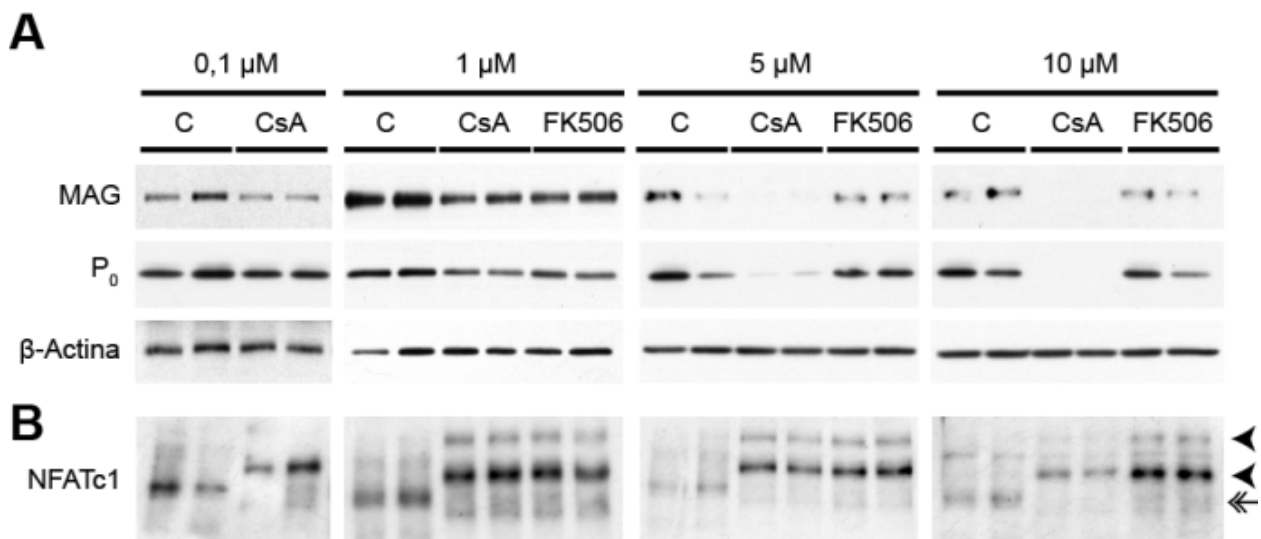


**Figura R-18: CsA produce un severo retraso de la maduración de los internodos de mielina.** Detalle de imágenes de microscopía convencional, mostrando internodos de mielina en alta magnificación. En condiciones control así como en presencia de  $5 \mu\text{M}$  de FK506 los internodos mostraron una apariencia madura, con MAG restringida a las regiones paranodales (cabezas de flecha) y en las incisuras de Schmidt-Lanternman (asteriscos), mientras que MBP está presente a lo largo de todo el internodo. Sin embargo, en presencia de  $5 \mu\text{M}$  de CsA los pocos internodos presentes mostraron una apariencia irregular e inmadura, con ausencia de MBP y con MAG repartida por todo el internodo (doble flecha).

### 2.2.1.3. Las acciones de CsA sobre la mielina periférica son calcineurina-independientes.

Debido a la alta regulación a la que está sometida la mielinización, los efectos deletéreos sobre la misma pueden estar ocasionados por cualquier desequilibrio del proceso, ya que no sólo una menor cantidad de proteínas puede provocar una inhibición en el proceso de mielinización, sino que los incrementos en la producción de las mismas también desencadenan una menor formación de internodos de mielina. Por este motivo, se pasó a comprobar cómo se traducían bioquímicamente los efectos morfológicos observados, determinando para ello los niveles totales de acumulación de algunas de las principales proteínas integrantes de la mielina. Para ello, cocultivos de neuronas DRG con SCs en condiciones mielinizantes se mantuvieron durante 5 días en presencia de

diferentes dosis de CsA o bien de FK506, tras lo cual se obtuvieron extractos solubilizados de proteínas, que se resolvieron mediante WB para analizar la acumulación de las proteínas de mielina p0 y MAG. El tratamiento con CsA se tradujo en una potente disminución en los niveles de acumulación de ambas proteínas, siendo aún más acusado en el caso de p0. De nuevo, esta disminución fue dependiente de dosis. De esta manera, a 0,1  $\mu$ M de CsA los niveles de MAG y p0 apenas se mostraron afectados, encontrándose tan solo ligeramente disminuidos. Sin embargo, a una dosis de CsA de 5  $\mu$ M los niveles de ambas proteínas ya son prácticamente indetectables. Cuando los cocultivos fueron mantenidos en presencia de FK506, los niveles de acumulación de proteínas de mielina tan solo se vieron ligeramente disminuidos, sin observarse mayores reducciones



**Figura R-19: CsA inhibe la acumulación de proteínas de mielina, de manera calcineurina-independiente.** Extractos solubilizados (1  $\mu$ g) de muestras procedentes de cocultivos mielinizantes tratados durante 5 días con CsA o FK506 a las dosis señaladas. **(A)** Los niveles de acumulación de p0 y MAG mostraron una importante disminución, dependiente de dosis, en presencia de CsA, que no pudo ser observada al añadir FK506. **(B)** La determinación de los niveles de fosforilación de NFATc1, que en presencia de las drogas inmunosupresoras se encuentra hiperfosforilado (cabezas de flecha), demostró que la calcineurina no participa en dicho efecto inhibitorio, al no correlacionar su inhibición con la menor presencia de proteínas de mielina.

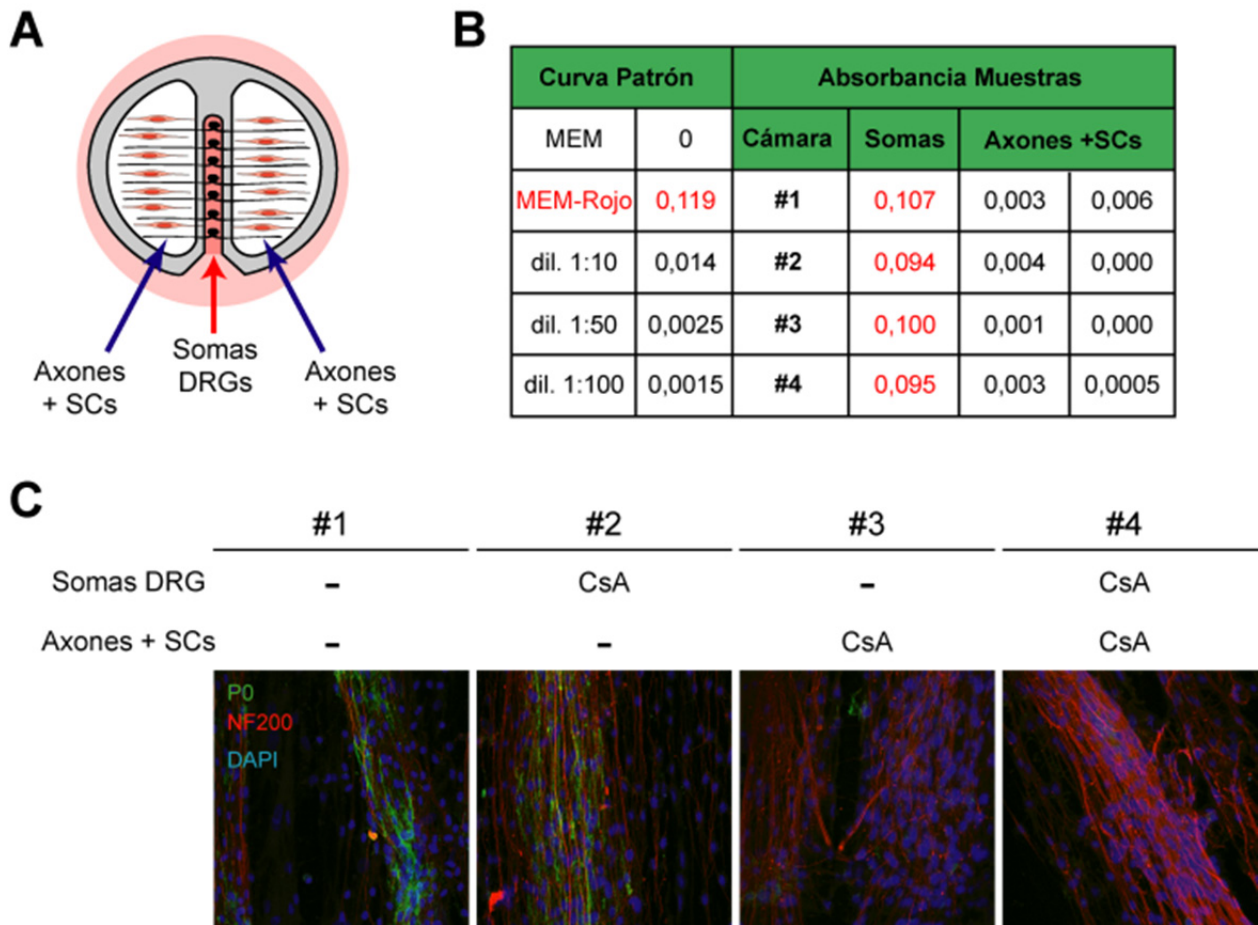


al aumentar la dosis (FIG R-19A).

Nuevamente, con el fin de comprobar que la dosis farmacológica utilizada de ambos compuestos inmunosupresores era de una eficacia equivalente, se utilizó como referencia el grado de inhibición de calcineurina. Para ello se comprobó mediante WB el estado de fosforilación de NFATc1. Al contrario de lo que ocurre en células PC12 o en cultivos primarios de neuronas purificadas, los niveles de expresión de NFATc1 fueron fácilmente detectables, probablemente debido al componente glial de los cocultivos. Asimismo, en cocultivos primarios de neuronas DRG con SCs en condiciones control se pudo detectar una gran presencia del factor en estado defosforilado, lo que indica que en estas condiciones calcineurina está basalmente activa, de acuerdo a lo descrito (Kao et al., 2009). En presencia tanto de CsA como de FK506, y a todas las dosis utilizadas, se produjo un claro retraso en la movilidad electroforética de NFAT-c1, lo que es característico de las formas hiperfosforiladas (FIG R-19B). Este dato indicó que los tratamientos utilizados eran capaces de inhibir por completo la actividad fosfatasa de calcineurina, incluso utilizando dosis tan bajas como 0,1  $\mu$ M de CsA. Sin embargo, estos niveles de inhibición no correlacionaron con la magnitud del efecto obtenido sobre la mielinización periférica. De este resultado se puede concluir que dicha acción es independiente de la interacción con calcineurina y que va a depender de otras rutas diferentes a las clásicas de actuación de las ciclofilinas.

### **2.2.1.4. Los efectos de CsA sobre la mielinización periférica están mediados por las SCs.**

Dado que el proceso de mielinización en el SNP implica dos tipos celulares diferentes, y que ambos tipos expresan ciclofilinas, resultaba de especial interés esclarecer qué tipo celular era responsable de las acciones deletéreas de CsA, pudiendo ser el elemento responsable las neuronas, las SCs o bien ambos tipos celulares en conjunto. Además, ambos tipos celulares expresan también p75<sup>NTR</sup>, así como TrkA en el caso de las DRGNs. Para tratar de esclarecer esta incógnita, se recurrió al establecimiento de cultivos compartimentalizados mediante la utilización de cámaras de Campenot, en las que se originan compartimentos estancos entre sí, lo que permite tratar de forma diferencial los somas neuronales y las regiones proximales de los axones de las neuronas DRG (situados en el compartimento central) frente a los axones distales de dichas mismas neuronas junto con las SCs, donde se va a formar la mielina (localizados en los compartimentos laterales) (FIG R-20A). Tras comprobar la integridad del aislamiento de los distintos compartimentos, mediante monitorización de la difusión de rojo fenol entre los compartimentos (FIG R-20B), se analizaron los niveles de formación de mielina mediante tinciones inmunocitoquímicas frente a la proteína de mielina p0 tanto en presencia como en ausencia de CsA. En todos los casos, la integridad axonal se visualizó mediante tinción inmunocitoquímica frente a la cadena pesada de neurofilamento.



**Figura R-20: Los efectos de CsA sobre mielinización periférica están mediados por las SCs.** Cocultivos de SCs y DRGNs en condiciones de formar mielina fueron mantenidos en cámaras compartimentalizadas Campenot. **(A)** Distribución de los distintos tipos celulares en los diferentes compartimentos del teflón. **(B)** Determinación mediante lectura de la absorbancia de la integridad de los compartimentos. **(C)** El tratamiento diferencial de los distintos compartimentos con CsA (5  $\mu$ M durante 15 días) determinó que la presencia de la misma en el compartimento donde se localizaban las SCs era suficiente para producir la inhibición del proceso de mielinización, mientras que al añadir CsA en las mismas condiciones sobre los cuerpos neuronales no se obtenía disminución.

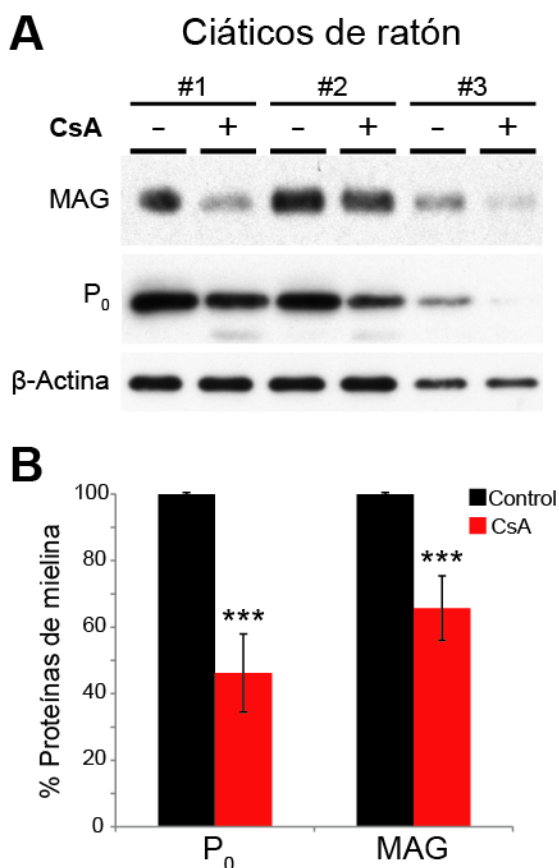
Con este modelo experimental se pudo comprobar que, el tratamiento con CsA durante la formación de mielina en el compartimento donde se localizaban los somas neuronales, los niveles de p0 eran muy similares a los observados en ausencia de CsA. Por el contrario, al incorporar CsA en los compartimentos donde se situaban las SCs junto a los axones, ésta provocó una drástica inhibición de los niveles de p0, de una forma equivalente a la observada en los estudios con cultivos no compartimentalizados, y de forma similar a lo

obtenido con la adición de CsA en ambos compartimentos (FIG R-20C). Este resultado indicaría que la simple adición de CsA a las neuronas no es suficiente para provocar la inhibición sobre el proceso de mielinización periférica, siendo necesario añadir CsA sobre las SCs para que ocurran las acciones de esta droga, por lo que parecería que éste es el tipo celular sobre el que actúa dicha droga inmunosupresora.

## 2.2.1.5. CsA disminuye la mielinización *in vivo* durante el desarrollo del nervio ciático.

Con el fin de comprobar si los efectos observados de CsA sobre la mielinización eran un reflejo de su implicación fisiológica durante el desarrollo normal, se realizaron ensayos *in vivo* durante el proceso de formación de mielina en el nervio

ciático, que ocurre en roedores durante los días posteriores al nacimiento. Para ello, se utilizaron crías de ratón recién nacidas, a las que se inyectó CsA a lo largo de una de sus patas en proximidad al nervio ciático, utilizando la pata contralateral a modo de control mediante la inyección de vehículo, determinando su efecto sobre la formación de mielina mediante el análisis de la acumulación de diferentes proteínas específicas de mielina.

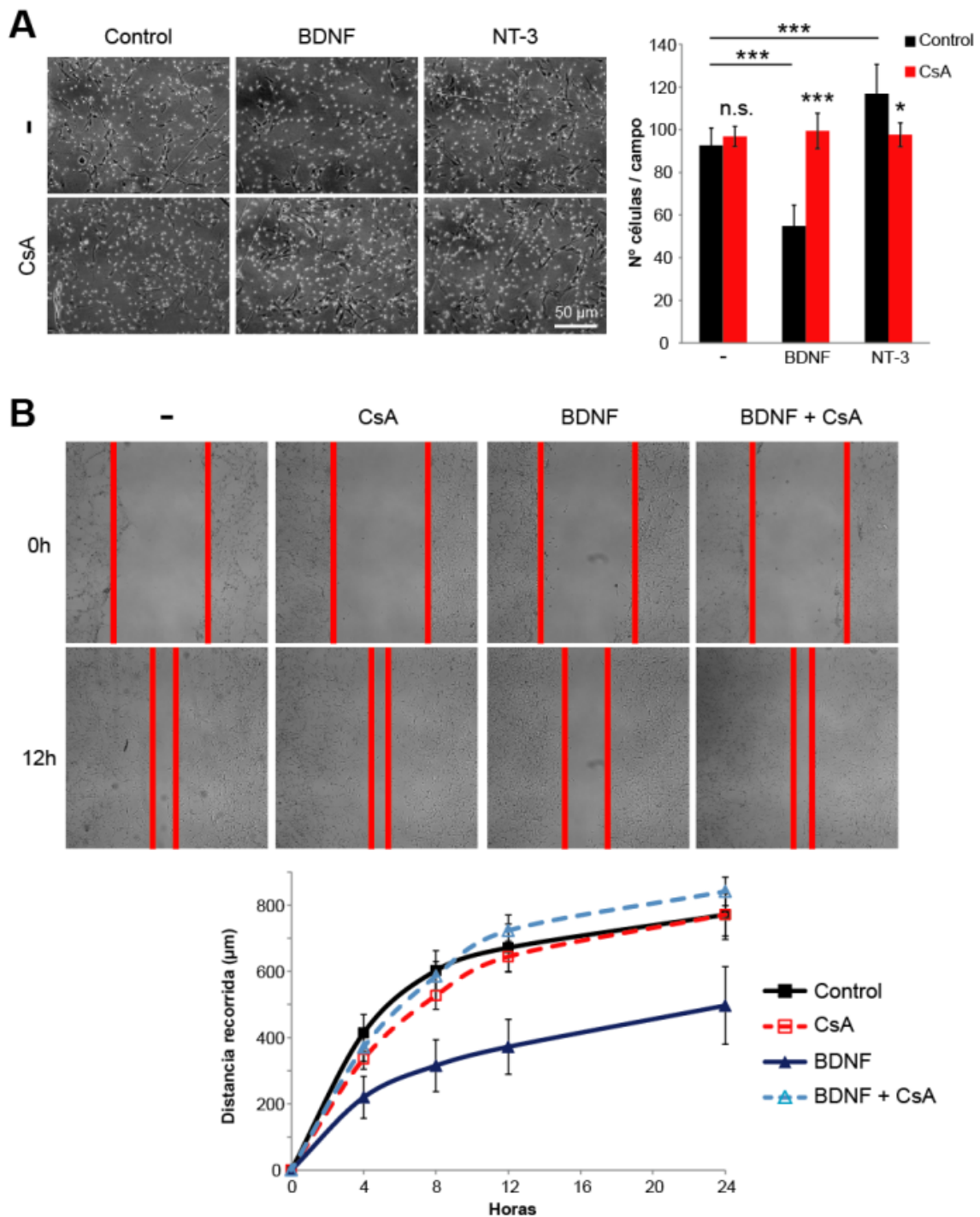


**Figura R-21: CsA reduce la mielinización *in vivo* durante el desarrollo del nervio ciático.** (A) Extractos de nervios ciáticos procedentes de ratones (P4), que fueron inyectados con 5  $\mu$ M de CsA en una de sus patas o con vehículo en la pata contralateral al día de nacer (P1). Se resolvieron 100 ng de extracto por WB y fueron revelados contra las proteínas de mielina MAG y P0, comprobando importantes disminuciones en los niveles de ambas en presencia de CsA. (B) Cuantificación densitométrica de proteínas de mielina de varios animales (n = 7), utilizando como referencia la expresión en el nervio ciático de la pata control de cada animal (media del

El análisis de los datos mediante WB demostró que se producía una importante disminución en la acumulación de proteínas de mielina en los nervios ciáticos que habían sido expuestos a la presencia de CsA. En concreto, la cantidad de p0 se redujo en más de un 50% con respecto a la obtenida en los nervios tratados con vehículo, y MAG disminuyó sus niveles en aproximadamente un 35% (FIG 21). Estos datos permitieron confirmar que el bloqueo de las ciclofilinas con CsA también produce efectos deletéreos sobre el proceso de mielinización periférica durante el desarrollo de animales, de manera similar a lo que ocurre en condiciones de cultivo *in vitro*.

## 2.2. CsA es capaz de bloquear la migración de las SCs mediada por p75<sup>NTR</sup>.

Otro de los procesos fisiológicos que se encuentra regulado por las neurotrofinas es la migración de las SCs, que es un proceso esencial en los estadios previos a la formación de mielina en el SNP y durante el cual se expresan elevados niveles de p75<sup>NTR</sup>. En SCs, bajas concentraciones de NT-3 son capaces de producir un efecto estimulador sobre la migración, mediante la activación de TrkC



**Figura R-22: CsA bloquea los efectos sobre la migración de SCs mediados por p75<sup>NTR</sup>.** (A) Ensayos de trans migración activa de SCs en cámaras Boyden. Tras 7 h en presencia de 250 ng/ml de BDNF se observó un menor número de SCs en la parte inferior del filtro. El pretratamiento con 5  $\mu$ M de CsA abolió por completo la acción del BDNF, no observándose diferencias con la condición control. Las cuantificaciones son la media de al menos 5 campos diferentes +/- desviación estándar. (B) Seguimiento durante 24h del cierre de heridas en monocapa de SCs. El BDNF (250 ng/ml) produjo un destacado retraso en la distancia recorrida por las células, mientras que al combinar el BDNF con 5  $\mu$ M de CsA se eliminó por completo dicho retraso (cuantificación de 4 experimentos +/- SEM).

(Yamauchi et al., 2003). Por el contrario, BDNF a altas concentraciones es un elemento regulador

negativo de la migración de las mismas células, inhibiendo la misma en un proceso mediado por

p75<sup>NTR</sup> (Yamauchi et al., 2003, Yamauchi et al., 2004).

Partiendo de esta premisa se quiso comprobar la influencia de la interacción de las ciclofilinas con p75<sup>NTR</sup> durante los procesos migratorios de las SCs, para lo cual se realizaron ensayos de trans migración activa en cámaras de Boyden. En estos ensayos las neurotrofinas se colocaron en el compartimento inferior, para así formar un gradiente hacia el compartimento superior, en el que se depositaron las SCs. Además, se añadió o no CsA como elemento bloqueante de ciclofilinas, en ambos compartimentos de manera que las células siempre estuvieran en presencia de la misma. De forma similar a lo descrito en la literatura, tras 7 h en presencia de 250 ng/ml de BDNF se produjo una disminución de más de un 40% en el número de células que migraban desde el compartimento superior al inferior de las cámaras. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas previamente con 5  $\mu$ M de CsA, que por sí sola no tuvo ningún efecto sobre la migración de las SCs, se pudo observar que el número de células migratorias recuperaba los valores observados en condiciones control, bloqueando por tanto el efecto negativo producido por la unión de BDNF a p75<sup>NTR</sup>. Cuando las migraciones se realizaron en presencia de una concentración intermedia de 25 ng/ml de NT-3 se pudo apreciar un ligero incremento sobre el número de células migrantes, que nuevamente se perdía en presencia de CsA (FIG R-22A).

Para confirmar la modulación producida sobre el efecto antimigratorio del BDNF, se llevó a cabo otro tipo de ensayo de migración celular, en este

caso de cierre de heridas sobre una monocapa de SCs, realizando un seguimiento continuado del cierre de la herida durante 24 h mediante un microscopio automatizado con cámara de incubación incorporada. A diferencia de los ensayos de trans migración con cámaras Boyden, donde se observa una migración celular activa, en los ensayos de monocapa se observa la migración de las células sobre zonas donde previamente ha habido otras células, que han secretado matriz extracelular. Tras sembrar las SCs en monocapa y someterlas a un pretratamiento con CsA a 5  $\mu$ M o el vehículo correspondiente, se realizó la herida, y se incorporó medio suplementado o no con BDNF, procediéndose al seguimiento continuado de las migraciones. En consonancia con los resultados obtenidos en los ensayos de trans migración en cámaras de Boyden, el BDNF fue capaz de producir un destacado retraso del cierre de la herida, reduciendo notoriamente la velocidad de avance de las SCs. En concreto, a las 12 h tras el tratamiento, la distancia recorrida por el frente de células en presencia de BDNF fue un 55% menor a la recorrida en ausencia de la neurotrofina. Cuando se incorporó BDNF en presencia de CsA, sin embargo, no se pudo apreciar ningún retraso en el cierre de la herida, obteniendo una velocidad de migración equivalente a la obtenida en condiciones control (FIG R-22B).

En ambos tipos de ensayo de migración se observó que CsA fue capaz de revertir por completo los efectos negativos mediados por el receptor p75<sup>NTR</sup> sobre la migración de las SCs producidos por la neurotrofina BDNF. Se trata, por tanto, de un nuevo ejemplo de bloqueo de las acciones de dicho receptor neurotrófico al proceder al bloqueo de



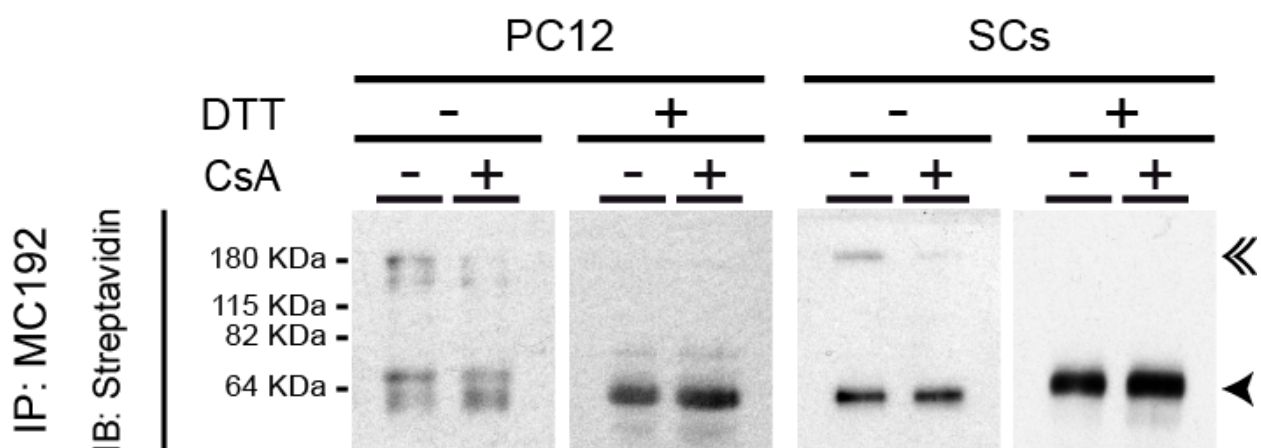
ciclofilinas, apuntando nuevamente a una colaboración funcional entre ambas vías.

### 3. El tratamiento con CsA reduce la dimerización del receptor p75<sup>NTR</sup>.

Como ya se ha mencionado anteriormente, a pesar de los numerosos estudios sobre los procesos de señalización mediados por p75<sup>NTR</sup>, el mecanismo de activación propiamente dicho del receptor ha permanecido como una incógnita a lo largo de los años. En este aspecto, recientemente ha sido publicado un estudio que el que se describe que la formación de dímeros de p75<sup>NTR</sup> unidos por puentes disulfuro es esencial en su señalización en respuesta a neurotrofinas. Concretamente, se identificó la cisteína 257, localizada en la región transmembrana del receptor, como elemento fundamental en el puente disulfuro que conforma la unión del dímero. La formación de estos dímeros es descrita como indispensable para la transducción de señales al interior celular, pero no

parece intervenir en la señalización mediada por ligandos de p75<sup>NTR</sup> diferentes a las neurotrofinas, como MAG (Vilar et al., 2009a). Puesto que esta descripción es una de las pocas aproximaciones a los mecanismos de respuesta de p75<sup>NTR</sup>, se quiso comprobar si las ciclofilinas tendrían alguna relevancia en la formación de estos dímeros y, por tanto, en la transducción de señales mediada por el receptor.

Para ello, se procedió a caracterizar el efecto de CsA sobre la abundancia de los dímeros de p75<sup>NTR</sup> presentes en la membrana plasmática. Tras preincubar células PC12 o SCs con CsA durante 1h se marcaron las proteínas de membrana con biotina, tras lo cual se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de p75<sup>NTR</sup>. Tras su resolución por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, se analizó la proporción de dímeros de p75<sup>NTR</sup> presentes en membrana mediante el revelado con estreptavidina. Las condiciones no reductoras



**Figura R-23: CsA afecta a la dimerización de p75<sup>NTR</sup>.** Células PC12 y SC fueron tratadas con 5  $\mu$ M de CsA durante 1 hora y posteriormente marcadas con biotina para el análisis de proteínas de superficie. A continuación se procedió a la inmunoprecipitación de p75<sup>NTR</sup> y su resolución por WB en condiciones reductoras (+DTT) y no reductoras (-DTT). La visualización se llevó a cabo por estreptavidina-HRP. En presencia de CsA se detectó una menor cantidad de dímero (flecha doble) frente a monómero (flecha simple), tanto en células PC12 como en SCs.

permiten la identificación en el gel de monómeros y dímeros, en función de su peso molecular aparente. Tanto en células PC12 como en SCs, se pudo apreciar la presencia de dímeros de p75<sup>NTR</sup>. Al pretratar ambos tipos celulares con CsA la proporción de los dímeros del receptor de neurotrofinas fue mucho menor a la observada en condiciones control, observando una disminución cercana al 60% en células PC12 y de hasta un 75% en SCs. Curiosamente, la presencia de CsA produjo un ligero incremento en la cantidad total de p75<sup>NTR</sup> presente en la membrana en ambos tipos celulares, lo que puede ser apreciado más claramente en condiciones no reductoras (FIG R-23).

Por tanto, el bloqueo de la interacción entre CypB y p75<sup>NTR</sup> mediante CsA produce una menor acumulación de dímeros de receptores de neurotrofinas presentes en la membrana plasmática, tanto de células PC12 como SCs. Ya que la dimerización se describe como esencial en la señalización, el hecho de encontrar menor proporción de dímeros de p75<sup>NTR</sup> pudiera ser responsable de una menor respuesta de dicho receptor a la presencia de neurotrofinas, y por tanto a sus acciones asociadas.





## *Discusión*



Trascurridos casi 40 años desde el descubrimiento de p75<sup>NTR</sup>, todavía existen numerosas lagunas acerca de sus mecanismos de acción y señalización. Este receptor continúa siendo el *rara avis* dentro de la señalización neurotrófica, así como dentro de la familia de receptores de TNF. Su versatilidad podría ser considerada una de sus principales características, y de hecho cada vez se le otorgan más y más funciones, interacciones con diferentes elementos y diversos mecanismos de transducción de señales, tanto dentro como fuera del contexto del sistema nervioso. En las últimas décadas ha sido implicado en contextos tan dispares como la regulación de los receptores Trk, la mielinización periférica, el control de la apoptosis de varios tipos de neuronas o la enfermedad de Alzheimer; o en otros aspectos, como la vascularización y función cardíaca, o la respuesta inmune.

Teniendo tantas funciones resulta llamativo que todavía no se hayan esclarecido por completo los mecanismos de señalización de este receptor. Surge, por tanto, la necesidad de continuar buscando nuevos interactores, ligandos y correceptores para p75<sup>NTR</sup>, que puedan aportar nuevas pistas sobre sus mecanismos de acción y permitan profundizar en la relevancia fisiológica de este receptor dentro del amplio abanico de funciones en las que participa y que, además, permitan ahondar en sus posibles aplicaciones terapéuticas. Partiendo de esta premisa, la descripción de un nuevo interactor, que además hemos comprobado que es capaz de afectar a la señalización mediada por p75<sup>NTR</sup>, es de gran relevancia y puede resultar de gran interés en las mencionadas incógnitas.

### **1. CypB interacciona de manera física con p75<sup>NTR</sup>.**

El interés principal en el presente estudio consistía en validar la interacción entre CypB y el receptor p75<sup>NTR</sup>. Dicha interacción, detectada por primera vez en un rastreo de interactores de amplio espectro, supuso el punto de partida de los estudios realizados. Para asegurar la fiabilidad de las interacciones observadas se identificaron sólo aquellas bandas que se obtuvieron en los dos sistemas utilizados, células PC12 y médulas espinales de rata. De entre los elementos identificados se eligió CypB por ser un elemento no descrito hasta el momento y por su potencial como posible elemento modulador. Al tratarse de un interactor para p75<sup>NTR</sup> de una familia que no había sido relacionada hasta el momento con dicho receptor, podría llegar a despejar las dudas sobre sus mecanismos de señalización. Por otro lado, las actividades fisiológicas de las ciclofilinas están en su mayoría por definir, ya que todavía se desconocen en gran medida las funciones celulares que realizan estos elementos tan conservados en la escala evolutiva. Las inmunofilinas son ampliamente conocidas debido a su capacidad de interacción con las drogas inmunosupresoras, que son elementos exógenos derivados de hongos, y no forman parte de la fisiología celular. Este hecho, junto con la gran abundancia de las ciclofilinas parece indicar que sus acciones derivadas de la interacción con estas drogas, como son las relacionadas con la inmunosupresión, se van a deber mayoritariamente a un efecto de ganancia de función, y no así a sus procesos fisiológicos. El estudio de esta interacción de CypB, que se da al margen de su unión a CsA podría arrojar indicios

sobre sus funciones en la célula, al margen de sus actividades inmunosupresoras.

La interacción entre ambos elementos pudo ser confirmada de tres maneras diferentes, como son la coimmunoprecipitación, el arrastre mediante proteínas de fusión a GST, y la colocalización subcelular observada mediante tinciones inmunocitoquímicas. Con las dos primeras se pudo constatar que existe una interacción física entre ambos elementos, que además se obtuvo en dos sistemas celulares distintos, la línea celular PC12 y en cultivos primarios de SCs de rata, y se ha conseguido reproducir usando como cebo cada una de las dos proteínas y consiguiendo la opuesta por arrastre. Los resultados obtenidos por inmunoprecipitación no permiten afirmar si se trata de una interacción directa o si en ella intervienen más elementos, al realizarse todo el tiempo utilizando extractos celulares solubilizados. Para demostrar que la interacción es o no directa sería necesario realizar experimentos de interacción de tipo “pull down”, expresando *in vitro* las dos proteínas purificadas. Además, resultaría de gran interés caracterizar cuáles son los dominios por los que interaccionan ambos elementos, lo que sería respondido con experimentos de interacción utilizando los distintos dominios de cada una de las proteínas por separado. Estas aproximaciones clarificarían la naturaleza de dicha interacción y sus características intrínsecas.

Las inmunoprecipitaciones fueron realizadas utilizando las proteínas en sus condiciones nativas, sin recurrir a la sobreexpresión de ninguno de los elementos, ni a la modificación de los mismos con

la inclusión de etiquetas como HA o Tag. Por lo tanto se puede concluir que la interacción que se da es endógena. Además, el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación de p75<sup>NTR</sup>, MC192, reconoce la proteína solamente cuando su estructura está intacta, por lo que se descartan los artefactos debidos a cambios en su estructura durante las inmunoprecipitaciones. Confirmando nuestras ideas iniciales sobre la especificidad de esta interacción, no se pudo apreciar interacción entre p75<sup>NTR</sup> y otra ciclofilina, como es CypA, que no se puede detectar en ninguno de los casos observado. A pesar de las similitudes estructurales entre CypA y CypB y a compartir algunos interactores como calcineurina, cada una de estas ciclofilinas es capaz de unirse con proteínas específicas de manera independiente a la otra, y sus contextos celulares son sustancialmente diferentes (Schiene-Fischer et al., 2013, Wang and Heitman, 2005).

Respecto a la localización subcelular, los resultados fueron dispares, variando en función del tipo celular analizado. En SCs y en menor medida en las neuronas DRG se obtuvieron elevados niveles de colocalización. Esta superposición en las señales obtenidas se pudo observar especialmente asociada a estructuras subcelulares discretas, con apariencia vesicular. Es decir, no solamente p75<sup>NTR</sup> y CypB pueden interaccionar físicamente, sino que en células primarias ambos elementos se sitúan en los mismos compartimentos en espacio y tiempo. Sorprendentemente, en células PC12 y neuronas SCG el resultado fue diferente, encontrando niveles muy bajos de colocalización, llegando incluso a una aparente deslocalización o exclusión entre ambas proteínas.

Resulta especialmente curioso en el caso de PC12, donde se había podido caracterizar la interacción previamente por IP. Sin embargo, esta disparidad de resultados puede estar debida al diferente ámbito celular, o incluso a posibles diferencias en las condiciones basales de respuesta a neurotrofinas que puedan tener dichas células. En cualquier caso, aunque la coinmunolocalización en condiciones basales en células PC12 era mucho menor que la apreciada en otros tipos celulares, su estudio en profundidad mediante herramientas bioinformáticas permitió determinar un ligero incremento, estadísticamente significativo, en la colocalización de ambos elementos en presencia de neurotrofinas. Este aumento en la coincidencia entre ambos elementos, además, se veía nuevamente disminuido al incorporar CsA, lo que concuerda con lo observado en SCs y lo obtenido en los estudios de inmunoprecipitación. Estas diferencias en el estado basal de ambos elementos pueden ser originados por la presencia o no en el medio de neurotrofinas secretadas de manera endógena por las propias células, como ocurre en SCs (Frostick et al., 1998), que van a alterar los niveles intracelulares de p75<sup>NTR</sup>.

Una primera cuestión, independientemente de la presencia de neurotrofinas, sería determinar cuáles son los posibles elementos diferenciales a nivel molecular que van a provocar esta dependencia del contexto celular en la localización de p75<sup>NTR</sup> y CypB. Un primer factor diferencial es la presencia o no de TrkA. Las SCs carecen de TrkA, que si se expresa a muy altos niveles tanto en neuronas SCG como en células PC12 (que, al fin y al cabo, no son más que un modelo celular de neuronas simpáticas, con gran similitud a las neuronas

SCG). Las neuronas DRG son un elemento intermedio, al expresar grandes cantidades de TrkA en los momentos iniciales del desarrollo, que va disminuyendo a medida que maduran tanto *in vivo* como *in vitro*. En nuestras condiciones experimentales, las neuronas DRG todavía expresan TrkA y, aunque los cultivos utilizados en el estudio todavía no han desarrollado por completo su independencia trófica de NGF (Lindsay, 1988), el hecho de recibir un aporte exógeno continuado de esta neurotrofina puede estar comenzando a modificar la expresión y/o localización tanto de TrkA como de p75<sup>NTR</sup>. Resultaría interés añadido, además, conocer el ratio existente entre las cantidades de ambos receptores, puesto que elevados niveles de TrkA pueden conllevar cambios en la disposición de p75<sup>NTR</sup>, al interactuar ambos.

Existen, al margen de TrkA, otros elementos que pueden estar modulando esta deslocalización. La expresión o no de otros interactores de p75<sup>NTR</sup> como, por ejemplo, sortilina también podría estar modificando la distribución subcelular de este receptor y, por tanto, su capacidad para colocalizar con CypB. La expresión de sortilina, que ha sido asociado con p75<sup>NTR</sup> como elemento responsable de sus acciones proapoptóticas en respuesta a proNGF, varía en función del tipo celular. Así, mientras en SCs no se detecta la presencia de sortilina (Nykjaer et al., 2004), en PC12 y SCG sí que se expresa de forma prominente (Nykjaer et al., 2004, Sobottka et al., 2008). En neuronas DRGs, sin embargo, los datos son variables, y parece que existen diferentes poblaciones neuronales, algunas de las cuales coexpresan sortilina y p75<sup>NTR</sup> y otras no (Arnett et al., 2007,

Vaegter et al., 2011). Debido a esta correlación entre la coexpresión de sortilina y p75<sup>NTR</sup> con el nivel de colocalización observado entre p75<sup>NTR</sup> y CypB resultaría de gran interés analizar el posible efecto del aumento o la disminución de los niveles de sortilina sobre la colocalización entre p75<sup>NTR</sup> y CypB según el tipo celular. Para ello, por ejemplo, se podría expresar sortilina en SCs (lo que se ha demostrado que las capacita para lanzar respuestas apoptóticas vía p75<sup>NTR</sup> (Teng et al., 2005) y comprobar el grado de colocalización p75<sup>NTR</sup>-CypB. Alternativamente, podrían disminuirse los niveles de sortilina en PC12 y comprobar si esto provoca un aumento en la colocalización entre p75<sup>NTR</sup> y CypB. Independientemente de TrkA y sortilina, hay otros posibles elementos que también podrían estar modulando esta interacción, como es el caso de Kidins220/ARMS, capaz de interactuar tanto con Trk como con p75<sup>NTR</sup> (Chang et al., 2004), y cuya interacción está modulada por la unión de neurotrofinas.

De extraordinario interés es el hecho de que, no sólo las neurotrofinas son capaces de producir cambios en la interacción entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, sino que también la CsA es capaz de modular la capacidad de interacción entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, reduciéndola de manera muy aparente. En presencia del inmunosupresor se consiguió disminuir la capacidad de interacción física, como queda reflejado en los ensayos de inmunoprecipitación. A este respecto, se ha descrito que la unión de CsA es capaz de modificar la estructura terciaria de CypB (Mikol et al., 1994), lo que podría estar impidiendo de alguna forma su interacción con p75<sup>NTR</sup>. Pero, además, en presencia de CsA se pudo observar también una menor

colocalización subcelular en los tipos celulares en los que se observaba la misma en condiciones basales (SCs), o prevenir el incremento en la interacción que ocurría en presencia de neurotrofinas en células PC12. Este efecto de CsA es reminiscente de lo descrito para la interacción entre ciclofilinas y otras proteínas con las que interactúa de forma natural. Por ejemplo, la unión de CsA es capaz de eliminar la interacción observada entre CypB y la sinapsina I, una proteína asociada a vesículas sinápticas (Lane-Guermonprez et al., 2005). Por otro lado, la unión de CsA es capaz de modificar la localización subcelular de CypB, aumentando tanto su secreción en células HeLa (Price et al., 1994), como su presencia en el núcleo (Le Hir et al., 1995). En las células de origen neural utilizados, el tratamiento con CsA dio lugar tanto a su redistribución en el citoplasma, produciendo incrementos en el tamaño de las acumulaciones intracelulares de CypB, como a una mayor presencia en el interior de los núcleos. Esto es especialmente evidente en SCs, en las que la unión de CsA fue capaz de reducir la colocalización de CypB con p75<sup>NTR</sup>, quedando CypB concentrada en acumulaciones próximas al núcleo, sin afectar a la distribución aparente de p75<sup>NTR</sup>. En conjunto, nuestros datos indican que CsA modula la interacción de CypB con p75<sup>NTR</sup> mediante un doble mecanismo. Por un lado, modifica la localización celular de la primera, alejándola de los espacios donde esta interacción tiene lugar y, además, debe producir un cambio estructural en CypB que reduce su capacidad de interacción física con p75<sup>NTR</sup>.

### **2. CypB interfiere en las funciones del receptor p75<sup>NTR</sup>.**

Toda esta exquisita regulación en la interacción física entre CypB y p75<sup>NTR</sup>, que es altamente dependiente de tipo celular y puede ser regulada por ligandos de ambas proteínas, parecería indicar que existiese también una interacción funcional y que la inmunofilina pudiese jugar un papel fundamental en la capacidad de señalización de p75<sup>NTR</sup>, interactuando de algún modo con las rutas de señalización de este receptor. Como ya se ha descrito en la Introducción, la señalización vía p75<sup>NTR</sup>, que carece de actividad catalítica, va a depender de su interacción con diferentes elementos. Para el presente estudio, a pesar de la amplia batería de efectos fisiológicos que implican a p75<sup>NTR</sup>, se estudiaron dos tipos diferentes de rutas de señalización en respuesta a la unión de neurotrofinas: por un lado, la derivada de la interacción entre p75<sup>NTR</sup> y los receptores Trk; y por otro, la señalización vía p75<sup>NTR</sup> de manera independiente a Trk. En ambos casos se pudo comprobar que, efectivamente, al bloquear la interacción entre CypB y p75<sup>NTR</sup> utilizando CsA las respuestas de este receptor se vieron comprometidas, indicando, por tanto, la participación fundamental de CypB en la señalización mediada por p75<sup>NTR</sup>.

#### **2.1. El bloqueo de CypB reduce la actividad de la ruta de señalización NGF-TrkA-p75<sup>NTR</sup>.**

El primer y mejor descrito efecto funcional de p75<sup>NTR</sup> es, sin duda, la capacidad de p75<sup>NTR</sup> de aumentar la efectividad en la activación de TrkA por NGF. Esta activación es un proceso rápido y

bien caracterizado, que puede observarse en un sistema celular sencillo, como son las células PC12. Esta línea celular, que es considerada como el modelo neuronal de referencia en estudios de diferenciación neuronal por efecto de las neurotrofinas, expresa elevados niveles tanto de p75<sup>NTR</sup> como de TrkA. Está ampliamente caracterizado que p75<sup>NTR</sup> es responsable de producir un incremento en la potencia y eficacia de la respuesta de TrkA a NGF, provocando la así denominada respuesta de alta afinidad de TrkA y sus rutas asociadas (Barker and Shooter, 1994). Para determinar la posible intervención de CypB en este proceso se utilizó fundamentalmente la droga inmunosupresora CsA, debido a su capacidad de bloquear la actividad de todas las ciclofilinas. Además, como ya se ha mencionado, CsA reducía notablemente la capacidad de CypB para interaccionar con p75<sup>NTR</sup> por lo que parecía una buena aproximación para impedir la interacción entre CypB y p75<sup>NTR</sup>, de forma que, posteriormente, se pudiesen inducir las mismas con NGF y analizar los niveles de activación obtenidos.

En presencia de CsA, la respuesta de TrkA a NGF se redujo en gran medida, lo que se pone de relieve por una menor fosforilación de TrkA, tanto en tirosinas adaptadoras como la Y490, como en aquellas pertenecientes al bucle de autorregulación, como Y674 y Y675. Al existir una menor fosforilación de Y490 va a ocurrir un menor acoplamiento de proteínas adaptadoras, fundamentalmente de Shc, por lo que se debe producir una menor activación de las rutas dependientes del mismo. Consecuentemente, se pudo observar que al pretratar con CsA se

conseguía un menor nivel de fosforilación en la ruta de las MAPK dependiente de NGF (y no así de otros factores, como FGF), observándose disminuidos los niveles de pERK-1 y -2. Esta disminución en la capacidad de señalización vía MAPK de TrkA se manifiesta tanto durante la fase de activación inicial rápida y transitoria de esta ruta dependiente de Ras, como en la segunda oleada de activación más sostenida y posterior en el tiempo dependiente de Rap.

Estos resultados no son privativos de la línea celular PC12, sino que el efecto inhibitorio de CsA sobre la activación de TrkA pudo apreciarse, incluso de forma más pronunciada, en cultivos primarios de neuronas sensoriales (DRGs) y simpáticas (SCGs). Al poder extrapolar los resultados obtenidos en líneas celulares a un ámbito fisiológico, estos cobran un mayor peso en una posible implicación de las acciones de las ciclofilinas en el desarrollo o el correcto funcionamiento de la señalización neurotrófica en el sistema nervioso.

Estos datos en conjunto indicaban que, efectivamente, al bloquear las ciclofilinas con CsA se produce un efecto sobre la señalización de NGF Trk-dependiente similar al obtenido al bloquear las acciones colaborativas del receptor p75<sup>NTR</sup>, ya sea afectando a la capacidad del mismo para unir NGF o a las rutas intracelulares derivadas de dicha unión.

Independientemente de que existan otras ciclofilinas en la célula (especialmente la mayoritaria CypA) y de que CsA sea capaz de unirse a todas ellas bloqueando su acción, nuestros

resultados demuestran que los efectos de esta droga inmunosupresora sobre la señalización de NGF se deben a la mediación de CypB, ya que su eliminación por interferencia mediante shRNAs fue capaz de revertir en gran medida los efectos de CsA, no obteniéndose en su ausencia ninguna disminución en la activación de TrkA por NGF al pretratar con CsA lo que indicaría que CypB es necesaria para la cooperación de p75<sup>NTR</sup> en la respuesta de TrkA a NGF. Igualmente, esta menor activación de TrkA obtenida al tratar con CsA es debida al bloqueo de la actividad de p75<sup>NTR</sup> porque, no sólo es equivalente a la que se obtiene en modelos celulares carentes de p75<sup>NTR</sup>, sino que, en su ausencia (obtenida tanto mediante su eliminación por interferencia de ARN en células PC12, o por el uso de modelos heterólogos en presencia o ausencia de p75<sup>NTR</sup>), CsA no provocaba ningún efecto sobre la fosforilación de TrkA.

Nuestros datos demuestran, por tanto, que la interacción observada entre p75<sup>NTR</sup> y CypB no es solo física, sino que también afecta a la funcionalidad del receptor de neurotrofinas de alguna manera, impidiendo su correcto funcionamiento cuando se bloquea la misma. Como ya se ha comentado, existen distintas visiones acerca de cómo puede estar colaborando p75<sup>NTR</sup> con TrkA en la unión de NGF, aunque la mayoría de los modelos concuerdan en la necesidad de formación de un complejo heteromérico. En nuestro diseño experimental, se ha observado que la unión de CsA produce una disminución entre la interacción observada entre CypB y p75<sup>NTR</sup>. Por tanto, CypB podría resultar un elemento necesario para la interacción entre



p75<sup>NTR</sup> y TrkA, bien de manera directa, ejerciendo de nexos; o indirecta, alterando la estructura de p75<sup>NTR</sup> y pudiendo modular la interacción. Numerosos indicios en la bibliografía apuntan a la interacción física entre p75<sup>NTR</sup> y TrkA (Bibel et al., 1999). En un estudio reciente, al realizar estudios de espectrometría de masas del contenido de endosomas tempranos positivos para TrkA de células PC12 se pudo encontrar, entre muchos otros, la presencia de CypB (Harrington et al., 2011). Estos endosomas, formados tras unirse NGF a TrkA, son esenciales en la señalización y transporte anterógrado, y, a pesar de que no se identificó a p75<sup>NTR</sup> en ellos, la presencia de CypB podría determinar su participación en el complejo de señalización NGF-TrkA-p75<sup>NTR</sup>. Además, en nuestras condiciones hemos podido observar como la presencia de CsA conlleva una menor internalización de ambos tipos de receptores de neurotrofinas. Se pudo comprobar que dicha internalización, uno de los eventos esenciales en la señalización en respuesta a NGF, era considerablemente menor al pretratar con CsA, tanto en el caso de p75<sup>NTR</sup> como de TrkA. Nuevamente, se puede observar que el bloqueo de ciclofilinas utilizando CsA está produciendo un efecto negativo sobre la señalización neurotrófica. Uniendo estas observaciones con las anteriormente mencionadas se podría especular que CypB puede formar parte de los endosomas de señalización que se generan al unirse NGF a Trk, y que al bloquear la actividad de CypB con CsA se produzca una menor internalización de los mismos. En el caso de p75<sup>NTR</sup> puede estar ocurriendo algo similar, o incluso la propia interacción de CypB con p75<sup>NTR</sup> podría ser responsable de modular la internalización de TrkA. En cualquier caso, la

internalización de dichos receptores es crucial para sus rutas de señalización, lo que nos indica que la participación de CypB en dicho proceso será esencial en la inhibición de las respuestas de neurotrofinas que origina CsA.

El principal mecanismo de actuación de la CsA sobre las ciclofilinas, y en el que se basa su capacidad de actuar como droga inmunosupresora, es el de la inhibición de la fosfatasa calcineurina. Otra droga de origen natural, el FK506, es capaz de mimetizar este efecto inhibitorio de calcineurina a través de un mecanismo distinto gracias a su capacidad de unión a las FKBP, el otro gran grupo de proteínas que, junto con las ciclofilinas, constituye la familia de las inmunofilinas. A pesar de sus múltiples similitudes, existen algunas diferencias entre ciclofilinas y FKBP. Por ejemplo, solo las FKBP son capaces de unirse a la droga rapamicina, unión que no afecta a la actividad de calcineurina pero que sin embargo inhibe el complejo mTOR (Barik, 2006). Al contrario de lo que ocurre con calcineurina, FK506 no fue capaz de mimetizar la inhibición sobre la activación de TrkA producida por CsA. Este resultado nos indica que la acción sobre la señalización de NGF es exclusiva de las ciclofilinas, mientras que las FKBP no participan en dicho proceso. Adicionalmente, estos resultados nos indican que el proceso de señalización de TrkA va a ser independiente de la actividad de calcineurina. Esto es similar a lo que ocurre en otros fenómenos, como la participación de las ciclofilinas en los ciclos de algunos virus, que depende de la actividad chaperona de dichas proteínas. De manera similar al efecto observado sobre la inducción de TrkA, la replicación del

virus de la hepatitis C se bloquea en presencia de CsA, al impedirse la interacción entre CypB y la proteína vírica NS5B, mientras que este bloqueo no se produce en presencia de FK506 (Fernandes et al., 2007, Watashi et al., 2005). El hecho de que análogos no inmunosupresores de CsA, incapaces de estimular la interacción con calcineurina también interfieran en el ciclo de replicación viral (Paeshuyse et al., 2006), abre la puerta a que ocurra lo mismo en la modulación de la actividad de  $p75^{\text{NTR}}$  por el complejo CsA-CypB (Paeshuyse et al., 2006, Watashi and Shimotohno, 2007b, Watashi and Shimotohno, 2007a). Igualmente, la inhibición de calcineurina tampoco es necesaria para la participación de CypB en la síntesis y tráfico del cotransportador de sodio NaDC1 que, en este caso, depende de la actividad chaperona de CypB (Bergeron et al., 2011).

### **2.2. CsA como modulador de la señalización de $p75^{\text{NTR}}$ Trk-independiente.**

Además de su posibilidad de interactuar con la activación de los receptores Trk, la unión de neurotrofinas a  $p75^{\text{NTR}}$  también es capaz de producir respuestas de manera independiente a ellos. Así, se ha descrito que las neurotrofinas, a través de  $p75^{\text{NTR}}$ , participan directamente de forma independiente de Trk en distintos procesos fisiológicos, tales como activación el crecimiento axonal, la muerte y supervivencia celular, migración de células neurales o mielinización.

De entre todos ellos, nos hemos centrado en el análisis de la posible implicación de CypB en los procesos de formación de mielina periférica y migración de células de Schwann.

### **2.2.1. CsA es un potente regulador negativo de la mielinización periférica.**

Puesto que una de las principales acciones descritas para  $p75^{\text{NTR}}$  es su participación en la formación de la mielina periférica, se pasó a comprobar qué implicaciones tendría el bloqueo de CypB con CsA en dicho proceso. Este fenómeno es una respuesta fisiológica compleja que implica, además de una acción positiva de BDNF vía  $p75^{\text{NTR}}$ , la participación de otras neurotrofinas como NGF y NT-3, y de los receptores Trk.

Nuestros estudios demuestran fehacientemente que CsA es capaz de ejercer una inhibición drástica sobre la formación de mielina periférica tanto in vitro (usando un sistema mielinizante de cocultivos primarios de neuronas sensoriales y SCs) como in vivo (durante el desarrollo del nervio ciático), afectando a los niveles de acumulación de las principales proteínas de la estructura, como son p0 y MAG, así como a la formación y maduración de la unidad estructural de la misma, el internodo. Por otra parte, y en concordancia con los resultados obtenidos sobre la inhibición de las vías NGF-TrkA, la utilización del inmunosupresor FK506 no reprodujo los efectos provocados por CsA. El bloqueo de las rutas mediadas por FKBP's produjo apenas una ligera reducción sobre el número de internodos de mielina, reduciendo la acumulación total de proteínas sólo ligeramente y sin afectar en ningún modo a la maduración de los internodos de mielina. De nuevo, al igual que en los efectos Trk-dependientes antes descritos, las acciones de CsA son independiente de calcineurina, ya que su inhibición era total con ambos inmunosupresores y

en todas las dosis utilizadas, y por lo tanto no era responsable de las acciones observadas sobre la formación de mielina al utilizar CsA.

Estos resultados muestran, por tanto, una acción de las ciclofilinas independiente de la inmunosupresión, que relaciona a las ciclofilinas con el proceso de formación de mielina, ya sea de manera directa o mediante una posible interacción entre ciclofilinas y otras rutas de señalización relacionadas con la regulación del proceso de mielinización periférica, interacción que no se daría en el caso de FKBP. Por otro lado, nuestros datos indican que los efectos sobre mielina requieren dosis relativamente elevadas de CsA (de nuevo, de forma similar a lo que ocurre en la señalización vía Trk), a pesar de que su efecto inmunosupresor se da a dosis bastante menores. Así, a 0,1  $\mu\text{M}$  ya se aprecia una inhibición completa de calcineurina, lo que se demuestra por el hecho de que el factor de transcripción NFAT se encuentra totalmente hiperfosforilado; y, sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la formación de mielina a estas dosis es solo apreciable ligeramente y, en todo caso, similar al obtenido al utilizar FK506. Esta dependencia de dosis parece indicar la participación de ciclofilinas distintas a la A, que es la que mayor afinidad presenta por CsA y es la principal responsable de los efectos inmunosupresores de la droga. Así, a mayores dosis de CsA, la droga puede estar bloqueando, además de CypA, también CypB que, por analogía a lo observado en la activación de TrkA, es la principal candidata a ser la ciclofilina responsable del efecto observado.

La ligera disminución en el proceso de mielinización periférica que se observa en el caso del FK506 y a dosis bajas de CsA, tampoco es un efecto que se pueda pasar por alto. Sin embargo, el hecho de la inhibición de calcineurina por FK506 sea mucho más potente que la producida por CsA (Gold, 1997); y, que en nuestro modelo su acción sea mucho menos pronunciada y más similar a la encontrada en dosis bajas de CsA, apoya la idea de que se trata de efectos independientes. Trabajos recientes en la literatura (Kao et al., 2009) han demostrado la intervención de la ruta calcineurina/NFAT en la diferenciación de las SCs, lo que, a la larga, tendrá necesariamente que dar lugar a perturbaciones en el proceso de mielinización. En el sistema de cocultivos mielinizantes empleado, la proliferación y diferenciación de las SCs ocurre mayoritariamente de forma previa a la adición de los tratamientos, pero no se puede descartar que exista un cierto solapamiento de dichos procesos durante la fase de mielinización, ya que la sincronización de los cocultivos primarios no es total. Por tanto, puede ocurrir que el efecto sobre la formación de mielina atribuible a la inhibición de calcineurina se deba mayoritariamente a su capacidad de interferir en las etapas previas al proceso de mielinización como tal, actuando únicamente sobre la parte de la población glial más inmadura que todavía se encuentra en etapas premyelinizantes. Un dato que avalaría esta hipótesis es el hecho de que FK506, al contrario que CsA, sólo produce una disminución en el número de internodos formados, lo que podría ser perfectamente explicado por la presencia de un número menor de SCs maduras capaces de formar la envuelta de mielina debido a la interferencia en su proceso de diferenciación.

Por encima de ello, y con un efecto mucho más exacerbado, el tratamiento con dosis más elevadas de CsA produciría una potente inhibición del proceso de mielinización, de manera independiente a calcineurina y, probablemente, implicando a CypB. Este efecto afectaría esencialmente a la formación y a la maduración de la mielina como tal, sin afectar ni a la viabilidad de las células ni a su diferenciación, de forma similar a lo descrito con las neurotrofinas (Chan et al., 2001, Chan et al., 2004, Cosgaya et al., 2002).

Existe una cierta discrepancia en la literatura acerca del tipo celular sobre el que actuarán las neurotrofinas para regular el proceso de meilinizaci3n. Si bien los experimentos que determinaron los efectos positivos de BDNF sobre la mielinizaci3n perif3rica v3a p75<sup>NTR</sup> (Cosgaya et al., 2002) no determinaron en qu3 tipo celular se produce dicha se3alizaci3n, algunos datos parecen apuntar a un papel mayoritario de la SC en el mismo. Sin embargo, existen otras descripciones que describen a las neuronas como los elementos responsables de la se3alizaci3n de BDNF sobre la mielinizaci3n perif3rica (Xiao et al., 2009). No se puede, sin embargo, descartar que sea la interacci3n de las SCs y el ax3n el elemento esencial en el proceso. Est3 ampliamente estudiado que las c3lulas gliales y los axones a ser mielinizados forman una unidad estructural, donde se comparten receptores, efectores, y se dan todo tipo de se3ales auto y paracrinas. De hecho, los datos que apuntan a las neuronas como elementos responsables no permiten descartar que el BDNF sea internalizado en los somas neuronales y pueda ser transportado anter3gradamente, como se ha demostrado que ocurre (Ng et al., 2007), para ser

secretado en las regiones axonales y ejercer una acci3n paracrina sobre las SCs. Nuestros ensayos utilizando c3maras compartimentalizadas de Campenot demostrar3an que el efecto de CsA se estar3 dando de manera mayoritaria en los compartimentos donde est3n presentes las SCs y los axones de las neuronas. Esto parece indicar que es altamente probable que la regulaci3n del proceso de mielinizaci3n requiera de la acci3n de p75<sup>NTR</sup> en las c3lulas gliales, aunque no se pueda descartar del todo que los receptores p75<sup>NTR</sup> neuronales participen de alguna manera en el proceso.

### **2.2.2. CsA bloquea los efectos sobre migraci3n celular mediados por p75<sup>NTR</sup>.**

Como otro modelo de se3alizaci3n mediada por p75<sup>NTR</sup> en respuesta a neurotrofinas, procedimos a estudiar la mediaci3n de la migraci3n de SCs producida, principalmente, por BDNF. Este proceso es independiente de receptores Trk, siendo una respuesta mediada exclusivamente por p75<sup>NTR</sup>, en la que la uni3n de BDNF conlleva una menor migraci3n de las SCs. Al reproducir los experimentos de Yamauchi y colaboradores (Yamauchi et al., 2003, Yamauchi et al., 2004) se pudo comprobar que al pretratar con CsA se produc3a una reversi3n de los efectos sobre migraci3n de SCs mediados por BDNF y p75<sup>NTR</sup>. Es decir, la CsA impide la acci3n inhibitoria que tiene el BDNF sobre la migraci3n. Esta acci3n de p75<sup>NTR</sup> est3 mediada por la activaci3n de la quinasa Src, que a su vez activa el GEF Vav2 y, consecuentemente, a la GTPasa RhoA. Ser3a de gran inter3s comprobar si en respuesta al pretratamiento con CsA se estar3 produciendo una

menor activación de esas rutas, impidiendo los efectos antimigratorios del BDNF. En todo caso, el pretratamiento con CsA en ausencia de neurotrofinas no produjo ningún cambio en la migración de las SCs.

Por otro lado, el tratamiento con NT-3, a las dosis y condiciones utilizadas, produjo una ligera inducción de la migración de las SCs, que se veía revertida a valores similares a los de la condición control en presencia de CsA. Aunque se ha determinado que NT-3 a dosis bajas va a tener un efecto promigratorio vía TrkC (Yamauchi et al., 2003), no se puede descartar que  $p75^{NTR}$  pueda estar participando en el proceso. Además, se ha descrito que la activación simultánea de TrkC y  $p75^{NTR}$  con altas dosis de NT-3 (100 ng/ml), al contrario de lo que ocurre normalmente en otras respuestas a neurotrofinas, va a resultar en una predominancia de la señal vía  $p75^{NTR}$ , lo que da lugar en este caso a una inhibición de la migración de las SCs (Yamauchi et al., 2004). En nuestras condiciones de experimentación la dosis de NT-3 utilizada en los tratamientos fue intermedia (25 ng/ml), y resultó en un aumento en la capacidad migratoria de las SCs, mucho menor que el observado por otros autores empleando dosis más elevadas, pero aparentemente mediado por  $p75^{NTR}$  al estar nuevamente modulado por CsA. La utilización de valores intermedios de la neurotrofina puede ser la responsable de esta disparidad con los datos bibliográficos.

La migración de las SCs es esencial en los pasos previos a la formación de mielina periférica, y durante estos estadios se expresan elevados niveles de  $p75^{NTR}$ . Además, cuando se producen daños

sobre la mielina, se inducen nuevamente procesos de migración de las SCs asociados a los fenómenos de degeneración Walleriana y posterior regeneración del nervio, y nuevamente se incrementan en gran medida los niveles de  $p75^{NTR}$ . Esta migración es esencial, puesto que las SCs se van a disponer formando haces de células alineadas, denominados como bandas de Bungner, para guiar a los nuevos axones en crecimiento.

### **3. CsA disminuye la dimerización de $p75^{NTR}$ .**

Como ya se ha mencionado previamente, a pesar del extenso número de trabajos sobre  $p75^{NTR}$ , los mecanismos de acción por los que actúa no están del todo claros todavía. Cómo los receptores no catalíticos como  $p75^{NTR}$  son capaces de regular su señalización en función de la unión de ligando es un aspecto mucho más complejo de explicar que en el caso de receptores tipo quinasa como los Trk. En este sentido, recientemente se ha descrito que la formación de dímeros del receptor, unidos por puentes disulfuro es un requerimiento necesario para que  $p75^{NTR}$  pueda realizar la mayor parte de sus funciones. Estos dímeros son esenciales en la respuesta a neurotrofinas del receptor y, sin embargo, no parecen afectar a la señalización mediada por otro tipo de ligandos, como MAG. En este trabajo se demuestra que la unión de NGF a la forma dimérica de  $p75^{NTR}$  produce cambios conformacionales en el mismo, que se transmiten al interior celular afectando a la unión de efectores intracelulares, como TRAF o NRIF, constituyendo por lo tanto un elemento central en la señalización neurotrófica de  $p75^{NTR}$  (Vilar et al., 2009a). Debido a la variedad de respuestas de  $p75^{NTR}$  que son abolidas en presencia de CsA, se quiso

comprobar si la presencia de esta droga era capaz de afectar a la presencia de esta forma dimerica, descrita como esencial en los mecanismos de activación de p75<sup>NTR</sup> en respuesta a la unión de neurotrofinas, sobre todo teniendo en cuenta la capacidad de CypB de interaccionar con PDI, una de las enzimas encargada de la generación de puentes disulfuro en otras proteínas (Horibe et al., 2002).

En las condiciones utilizadas, se apreció que la presencia de CsA provocaba una reducción muy notoria de la presencia en membrana de p75<sup>NTR</sup> en forma dimérica, sin que esta disminución sea debida a una menor disponibilidad del receptor en la membrana. De este resultado podrían surgir dos posibilidades. Por un lado, la presencia de CsA podría estar impidiendo la formación de estos dímeros, o bien podría estar perturbando a los dímeros ya formados en la membrana celular.

De las distintas ciclofilinas, el candidato más idóneo para estar afectando a la dimerización de p75<sup>NTR</sup> es CypB. CypB, se detecta de manera conjunta con p75<sup>NTR</sup> en diversos tipos celulares, como aquí ha sido demostrado, y lo hace en compartimentos intracelulares. El receptor p75<sup>NTR</sup>, como proteína transmembrana, se sintetiza en retículo endoplasmático, para posteriormente pasar a la red Trans-Golgi, donde se glicosila. Finalmente, va a alcanzar la membrana plasmática donde será capaz de unir sus ligandos, que se unen por su lado extracelular. CypB ha sido descrito asociado a estructuras de retículo/Golgi, por lo que coincide con p75<sup>NTR</sup> en el espacio. Nuestros estudios no nos permiten determinar si la interacción entre estos elementos ocurre por el

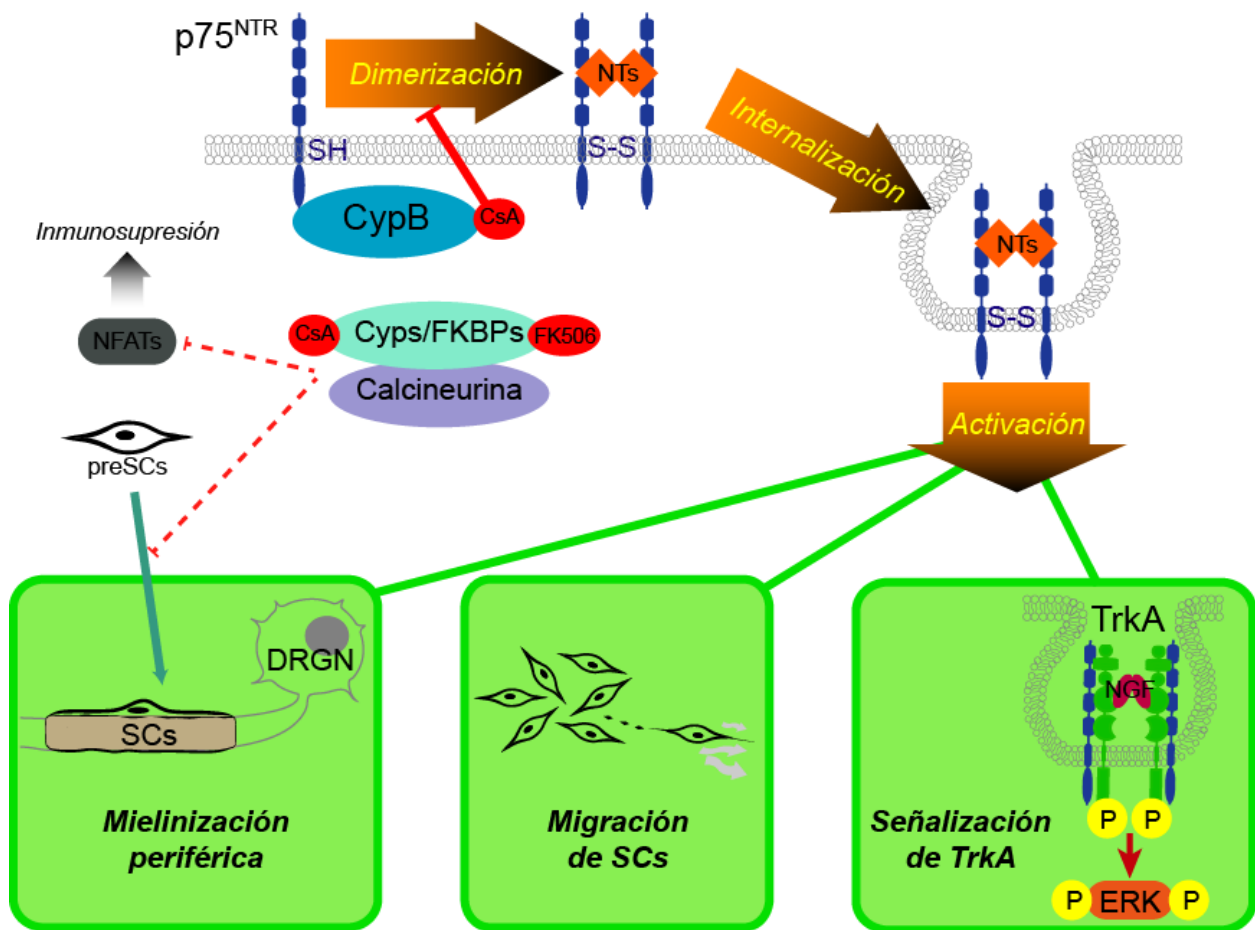
lado intracelular o extracelular de p75<sup>NTR</sup>. A pesar de que haya sido descrita como residente en retículo endoplasmático, que apuntaría a una posible interacción por el lado luminal-extracelular de p75<sup>NTR</sup>, CypB también ha sido detectada interaccionando con la proteína vírica NS5B en la cara citoplasmática del RE (Heitman and Cullen, 2005, Watashi et al., 2005). En cualquier caso, la participación de CypB en la formación y/o mantenimiento del puente disulfuro en el dímero de p75<sup>NTR</sup> es teóricamente igual de posible independientemente de su localización relativa, ya que el elemento esencial en la dimerización de p75<sup>NTR</sup>, la cisteína 257, se encuentra en la región intramembrana del receptor, por lo que cualquier interferencia a la formación de los dímeros puede estar relacionada con elementos cercanos a la membrana celular, siendo accesible desde ambas caras de la misma.

La actividad enzimática de CypB y todas sus descripciones como proteína acompañante, o chaperona, durante la transcripción y plegamiento de diversas proteínas, como por ejemplo en el caso del cotransportador de sodio NaDC1 (Bergeron et al., 2011), la convierten en una buena candidata para intervenir en la dimerización del receptor. Como añadido, CypB interacciona con PDI, una chaperona residente en retículo, que cataliza la formación, reducción e isomerización de enlaces disulfuro. Su interacción con CypB parece imprescindible para sus acciones como chaperona, ya que se observa que la unión de CsA inhibe drásticamente dicha acción (Horibe et al., 2002). Así, la cooperación entre CypB y PDI parece esencial para la regulación de la expresión funcional de algunas proteínas. Podría especularse



que la formación del puente disulfuro necesario para la dimerización de  $p75^{NTR}$  podría implicar a PDI, y que su inhibición mediante la unión de CsA y CypB podría estar afectando a la formación de estos dímeros, explicando los resultados obtenidos. Además, la interacción entre PDI y CypB se ha descrito como transitoria, detectándose principalmente en las fases finales de la etapa de translocación de proteínas de secreción (Klappa et al., 1995). Alternativamente, también se ha demostrado recientemente la interacción entre CypB y ERp72, otra isomerasa de puentes

disulfuro del lumen del retículo endoplasmático, que en este caso favorece el plegado y ensamblaje de IgG (Jansen et al., 2012). En definitiva, CypB es capaz de interaccionar con distintas chaperonas con actividad disulfuro isomerasa, constituyendo un posible nexo de unión con la formación de dímeros de  $p75^{NTR}$  y, por lo tanto, con su capacidad para señalizar como receptor de neurotrofinas. Un factor a tener en cuenta es que la perturbación en la formación de dímeros de  $p75^{NTR}$  obtenida en presencia de CsA se aprecia al utilizar pretratamientos de 1h (tiempo más corto utilizado



**Figura D-1: Resumen de las principales acciones de CsA sobre la señalización de  $p75^{NTR}$ .** La activación de  $p75^{NTR}$  por neurotrofinas, entre otros procesos, va a colaborar activamente con la activación de TrkA en respuesta a NGF, va a ejercer una modulación positiva sobre el proceso de mielinización periférica, y va a regular negativamente la migración de las SCs. Todos estos aspectos se ven alterados por la inhibición de CypB con CsA. Además, CsA modula negativamente la aparición de dímeros de  $p75^{NTR}$ . Puesto que la formación de estos dímeros es esencial en la señalización neurotrófica, su modulación puede resultar esencial en los efectos observados.

en estos ensayos) y que los efectos fisiológicos de CsA sobre la señalización por p75<sup>NTR</sup> pueden ser detectados en tiempos de hasta tan sólo 10 min de tratamiento con CsA, lo que indica que la presencia de CsA afecta a la dimerización de una manera relativamente rápida. Por lo tanto, no parecería que la menor presencia de dímeros se deba a alteraciones durante el proceso de síntesis de la proteína. Más bien, las acciones deberán estar ocurriendo en algún punto más cercano a la membrana celular, o bien la presencia de CsA va a afectar a los dímeros ya formados, eliminando o desestabilizando su interacción. Surge, en este caso, la posibilidad de que elementos como PDI, ERp72, o cualquier otra isomerasa de puentes disulfuro intervengan en la estabilidad de los dímeros, más que en su formación.

Finalmente, el hecho de que CypB esté involucrada en el proceso de dimerización de p75<sup>NTR</sup> y que este fenómeno pueda ser alterado farmacológicamente con CsA, nos debería permitir el deducir que esta ciclofilina podría estar involucrada en todos aquellos procesos en los que se ha descrito que la dimerización de p75<sup>NTR</sup> es esencial para su correcto funcionamiento (como puede ser en la regulación del proceso de muerte por apoptosis en diferentes tipos celulares) y que, por el contrario, no debiera participar en aquellos procesos neurotrofina-independientes (como la señalización MAG-dependiente mediada por el complejo p75<sup>NTR</sup>/NgR/Lingo-1) de acuerdo a lo descrito (Vilar et al., 2009a, Vilar et al., 2009b).

#### **4. Implicaciones fisiopatológicas y clínicas de la interacción CypB-p75<sup>NTR</sup>.**

Al margen de las implicaciones que resultan de la interacción funcional entre p75<sup>NTR</sup> y CypB, nuestro modelo presenta la caracterización de un elemento capaz de bloquear la señalización por p75<sup>NTR</sup>, para todas las acciones que han sido analizadas. Este fenómeno podría resultar de gran relevancia, dadas las implicaciones de p75<sup>NTR</sup> en diversos modelos neuropatológicos, como pueden ser la enfermedad de Parkinson, Alzheimer o en modelos de muerte neuronal mediada por dicho receptor (Dechant and Barde, 2002). Así, por ejemplo, la expresión de p75<sup>NTR</sup> se correlaciona con elevados niveles de neurodegeneración en modelos de enfermedad de Alzheimer (Mufson and Kordower, 1992) o enfermedad de la motoneurona (MND) (Lowry et al., 2001), donde su bloqueo mediante CsA podría conllevar menores progresos de la enfermedad. En otros fenómenos como isquemia o daño neural, se ha podido observar que el truncamiento del receptor es capaz de prevenir la muerte neuronal (DiStefano, 1993, DiStefano et al., 1993), lo que podría también reproducirse al bloquear la señalización. Sería, por supuesto, de gran interés analizar en detalle las posibles acciones de CsA sobre los fenómenos de muerte asociada a p75<sup>NTR</sup>, con el fin de poder identificar dianas terapéuticas para estos procesos neurodegenerativos.

En consonancia con los resultados obtenidos, existe un amplio espectro de trabajos que indicarían la existencia de efectos neurotóxicos asociados a los ligandos de inmunofilinas, en su mayoría al uso de CsA. Estos efectos han podido ser observados en estudios *in vitro* en células PC12, donde se ha comprobado efectos apoptóticos de los ligandos de inmunofilinas (Takadera et al., 2007) o que la sobreexpresión de



CypB protege contra la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Oh et al., 2011); pero, especialmente, durante su uso clínico como inmunosupresores (Bechstein, 2000). En un alto porcentaje de los pacientes tratados con CsA se observan numerosos efectos secundarios, siendo los más comunes de entre los asociados al sistema nervioso la aparición de temblores, parestesias y neuropatías periféricas (Gijtenbeek et al., 1999). Todos estos síntomas podrían ser atribuidos, en su totalidad o en parte, a problemas en el funcionamiento de la señalización por neurotrofinas, así como a la viabilidad de la envuelta de mielina. De manera más directa, se han podido observar efectos deletéreos sobre la formación de mielina en tratamientos con CsA durante experimentos de regeneración de nervios periféricos, que además son dependientes de dosis (Meirer et al., 2002, Siemionow and Sonmez, 2007). De manera similar a nuestros resultados, los efectos secundarios relacionados con la mielina no se observan con la misma intensidad en el caso de FK506, que incluso ha sido estudiado como agente neuroprotector o neurotrófico en múltiples casos (Gold et al., 2005, Steiner et al., 1997). Si se ha podido encontrar cierto efecto agravante de FK506 sobre la pérdida de mielina al utilizar modelos animales de desmielinización o de falta de mielina (Ip et al., 2009). Teniendo en cuenta nuestros resultados, estos efectos pueden ser reinterpretados bajo otro punto de vista, atendiendo a la participación de p75<sup>NTR</sup> en los procesos de mielinización y su bloqueo mediante CsA.

Todos estos aspectos nos indican la relevancia del receptor p75<sup>NTR</sup> en distintas facetas de la fisiopatología, haciéndolo un gran candidato para su estudio como diana terapéutica. Del estudio de

sus mecanismos de acción, su regulación y sus interacciones pueden surgir numerosas posibilidades de investigación para nuevas terapias en distintas neuropatías de gran relevancia en la salud humana. En este sentido, la descripción de CypB como una molécula de gran importancia en el mecanismo de acción de p75<sup>NTR</sup> podría proporcionarnos una diana terapéutica sobre la cual actuar fácilmente. La existencia de diferentes drogas moduladoras de CypB (gracias, esencialmente, al interés en su faceta como posibles inmunosupresores), muchas de las cuales ya se están testando y/o aprobando para su uso clínico, podría dar un fuerte espaldarazo a la faceta traslacional de este trabajo.



# *Conclusiones*



### Conclusiones

- 1.- La inmunofilina CypB y el receptor de neurotrofinas p75<sup>NTR</sup> interaccionan físicamente. Esta interacción es dependiente del contexto celular y está modulada por la unión tanto de CsA como de neurotrofinas.
- 2.- El bloqueo de CypB con CsA provoca un impedimento para la internalización de p75<sup>NTR</sup> en respuesta a neurotrofinas.
- 3.- CsA inhibe la activación, internalización y señalización del receptor TrkA en respuesta a NGF, en un proceso en el cual son necesarios tanto CypB como p75<sup>NTR</sup>.
- 4.- CsA ejerce un potente efecto inhibitor sobre la formación de mielina periférica tanto *in vitro* en cocultivos mielinizantes como *in vivo* durante el desarrollo del nervio ciático. Esta inhibición es una acción directa del inmunosupresor sobre las SCs.
- 5.- El inmunosupresor FK506 no modula la señalización de la vía TrkA y solo produce una moderada inhibición del proceso de mielinización, lo que implica que los efectos de CsA son independientes de la inhibición de calcineurina así como de las acciones de FKBP, siendo directamente dependientes de las rutas asociadas a Ciclofilinas.
- 6.- CsA es capaz de impedir la modulación que p75<sup>NTR</sup> y las neurotrofinas ejercen sobre la migración de las SCs.
- 7.- El tratamiento con CsA modula la dimerización del receptor p75<sup>NTR</sup>. Puesto que dicha dimerización es esencial sobre la transducción de señales en respuesta a neurotrofinas de dicho receptor, proponemos que dicho mecanismo es el responsable de las acciones descritas.



## *Bibliografía*





- ADAMS, B., MUSIYENKO, A., KUMAR, R. & BARIK, S. 2005. A novel class of dual-family immunophilins. *J Biol Chem*, 280, 24308-14.
- ANSARI, H., GRECO, G. & LUBAN, J. 2002. Cyclophilin A peptidyl-prolyl isomerase activity promotes ZPR1 nuclear export. *Mol Cell Biol*, 22, 6993-7003.
- ANTON, E. S., WESKAMP, G., REICHARDT, L. F. & MATTHEW, W. D. 1994. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2795-9.
- AREVALO, J. C. & WU, S. H. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*, 63, 1523-37.
- ARNETT, M. G., RYALS, J. M. & WRIGHT, D. E. 2007. Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain Res*, 1183, 32-42.
- ARROYO, E. J. & SCHERER, S. S. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol*, 113, 1-18.
- AVRAMUT, M. & ACHIM, C. L. 2002. Immunophilins and their ligands: insights into survival and growth of human neurons. *Physiology & behavior*, 77, 463-8.
- BAMJI, S. X., MAJDAN, M., POZNIAK, C. D., BELLIVEAU, D. J., ALOYZ, R., KOHN, J., CAUSING, C. G. & MILLER, F. D. 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol*, 140, 911-23.
- BARBACID, M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*, 25, 1386-403.
- BARIK, S. 2006. Immunophilins: for the love of proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2889-900.
- BARKER, P. A. 2004. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron*, 42, 529-33.
- BARKER, P. A. & SHOOTER, E. M. 1994. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron*, 13, 203-15.
- BARTYNSKI, W. S., ZEIGLER, Z., SPEARMAN, M. P., LIN, L., SHADDUCK, R. K. & LISTER, J. 2001. Etiology of cortical and white matter lesions in cyclosporin-A and FK-506 neurotoxicity. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22, 1901-14.
- BEATTIE, M. S., HARRINGTON, A. W., LEE, R., KIM, J. Y., BOYCE, S. L., LONGO, F. M., BRESNAHAN, J. C., HEMPSTEAD, B. L. & YOON, S. O. 2002. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, 36, 375-86.
- BECHSTEIN, W. O. 2000. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int*, 13, 133-26.
- BENITO-GUTIERREZ, E., GARCIA-FERNANDEZ, J. & COMELLA, J. X. 2006. Origin and evolution of the Trk family of neurotrophic receptors. *Molecular and cellular neurosciences*, 31, 179-92.
- BENITO-GUTIERREZ, E., NAKE, C., LLOVERA, M., COMELLA, J. X. & GARCIA-FERNANDEZ, J. 2005. The single AmphiTrk receptor highlights increased complexity of neurotrophin signalling in vertebrates and suggests an early role in developing sensory neuroepidermal cells. *Development*, 132, 2191-202.
- BENTLEY, C. A. & LEE, K. F. 2000a. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, 7706-15.
- BENTLEY, C. A. & LEE, K. F. 2000b. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci*, 20, 7706-15.
- BERGERON, M. J., BURZLE, M., KOVACS, G., SIMONIN, A. & HEDIGER, M. A. 2011. Synthesis, maturation, and trafficking of human Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter NaDC1 requires the chaperone activity of cyclophilin B. *J Biol Chem*, 286, 11242-53.
- BIBEL, M. & BARDE, Y. A. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*, 14, 2919-37.
- BIBEL, M., HOPPE, E. & BARDE, Y. A. 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J*, 18, 616-22.
- BLOCHL, A. & SIRRENBURG, C. 1996. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75Lnt receptors. *The Journal of biological chemistry*, 271, 21100-7.
- BOIKO, A. D., RAZORENOVA, O. V., VAN DE RIJN, M., SWETTER, S. M., JOHNSON, D. L., LY, D. P., BUTLER, P. D., YANG, G. P., JOSHUA, B., KAPLAN, M. J., LONGAKER, M. T. & WEISSMAN,

- I. L. 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, 466, 133-7.
- BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U. & STAHELIN, H. 1976. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 6, 468-75.
- BOSE, S., MUCKE, M. & FREEDMAN, R. B. 1994. The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans-isomerase from the endoplasmic-reticulum lumen. *Biochem J*, 300 ( Pt 3), 871-5.
- BOTCHKAREV, V. A., BOTCHKAREVA, N. V., PETERS, E. M. & PAUS, R. 2004. Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle. *Progress in brain research*, 146, 493-513.
- BOTHWELL, M. 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 18, 223-53.
- BRAATEN, D. & LUBAN, J. 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J*, 20, 1300-9.
- BRONFMAN, F. C., TCHERPAKOV, M., JOVIN, T. M. & FAINZILBER, M. 2003. Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome. *J Neurosci*, 23, 3209-20.
- CAMPENOT, R. B. 1977. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 4516-9.
- CANO, E., CANELLADA, A., MINAMI, T., IGLESIAS, T. & REDONDO, J. M. 2005. Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J Biol Chem*, 280, 29435-43.
- CARONI, P., ROTHENFLUH, A., MCGLYNN, E. & SCHNEIDER, C. 1991. S-cyclophilin. New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *J Biol Chem*, 266, 10739-42.
- CASADEMUNT, E., CARTER, B. D., BENZEL, I., FRADE, J. M., DECHANT, G. & BARDE, Y. A. 1999. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J*, 18, 6050-61.
- CLARY, D. O., WESKAMP, G., AUSTIN, L. R. & REICHARDT, L. F. 1994. TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol Biol Cell*, 5, 549-63.
- COHEN, E. & TARABOULOS, A. 2003. Scrapie-like prion protein accumulates in aggresomes of cyclosporin A-treated cells. *The EMBO journal*, 22, 404-17.
- COHEN, S., LEVI-MONTALCINI, R. & HAMBURGER, V. 1954. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1014-8.
- COLGAN, J., ASMAL, M., NEAGU, M., YU, B., SCHNEIDKRAUT, J., LEE, Y., SOKOLSKAJA, E., ANDREOTTI, A. & LUBAN, J. 2004. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity*, 21, 189-201.
- COLGAN, J., ASMAL, M., YU, B. & LUBAN, J. 2005. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol*, 174, 6030-8.
- CORBIT, K. C., FOSTER, D. A. & ROSNER, M. R. 1999. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Molecular and cellular biology*, 19, 4209-18.
- COSGAYA, J. M., CHAN, J. R. & SHOOTER, E. M. 2002. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science*, 298, 1245-8.
- CHAN, J. R., COSGAYA, J. M., WU, Y. J. & SHOOTER, E. M. 2001. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14661-8.
- CHAN, J. R., JOLICOEUR, C., YAMAUCHI, J., ELLIOTT, J., FAWCETT, J. P., NG, B. K. & CAYOUE, M. 2006. The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science*, 314, 832-6.
- CHAN, J. R., WATKINS, T. A., COSGAYA, J. M., ZHANG, C., CHEN, L., REICHARDT, L. F., SHOOTER, E. M. & BARRES, B. A. 2004. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*, 43, 183-91.
- CHANDLER, C. E., PARSONS, L. M., HOSANG, M. & SHOOTER, E. M. 1984. A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J Biol Chem*, 259, 6882-9.
- CHANG, M. S., AREVALO, J. C. & CHAO, M. V. 2004. Ternary complex with Trk, p75, and an ankyrin-rich membrane spanning protein. *J Neurosci Res*, 78, 186-92.

- CHAO, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4, 299-309.
- CHAO, M. V., BOTHWELL, M. A., ROSS, A. H., KOPROWSKI, H., LANAHAN, A. A., BUCK, C. R. & SEHGAL, A. 1986. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science*, 232, 518-21.
- CHEUNG-FLYNN, J., PRAPAPANICH, V., COX, M. B., RIGGS, D. L., SUAREZ-QUIAN, C. & SMITH, D. F. 2005. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol Endocrinol*, 19, 1654-66.
- CHITTKA, A., AREVALO, J. C., RODRIGUEZ-GUZMAN, M., PEREZ, P., CHAO, M. V. & SENDTNER, M. 2004. The p75NTR-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J Cell Biol*, 164, 985-96.
- CHITTKA, A. & CHAO, M. V. 1999. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10705-10.
- CHOI, J. W., SUTOR, S. L., LINDQUIST, L., EVANS, G. L., MADDEN, B. J., BERGEN, H. R., 3RD, HEFFERAN, T. E., YASZEMSKI, M. J. & BRAM, R. J. 2009. Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS Genet*, 5, e1000750.
- DAWSON, T. M., STEINER, J. P., LYONS, W. E., FOTUHI, M., BLUE, M. & SNYDER, S. H. 1994. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. *Neuroscience*, 62, 569-80.
- DECHANT, G. & BARDE, Y. A. 2002. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 5, 1131-6.
- DISTEFANO, P. S. 1993. Neurotrophic factors in the treatment of motor neuron disease and trauma. *Exp Neurol*, 124, 56-9.
- DISTEFANO, P. S., CHELSEA, D. M., SCHICK, C. M. & MCKELVY, J. F. 1993. Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 13, 2405-14.
- DOBROWSKY, R. T. & CARTER, B. D. 1998. Coupling of the p75 neurotrophin receptor to sphingolipid signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 845, 32-45.
- DOMANSKA-JANIK, K., BUZANSKA, L., DLUZNIEWSKA, J., KOZLOWSKA, H., SARNOWSKA, A. & ZABLOCKA, B. 2004. Neuroprotection by cyclosporin A following transient brain ischemia correlates with the inhibition of the early efflux of cytochrome C to cytoplasm. *Brain research. Molecular brain research*, 121, 50-9.
- DONG, Z., BRENNAN, A., LIU, N., YARDEN, Y., LEFKOWITZ, G., MIRSKY, R. & JESSEN, K. R. 1995. Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*, 15, 585-96.
- FAINZILBER, M. & CARTER, B. D. 2002. From neurotrophins to immunotrophins. NGF 2002: The 7th international conference on NGF and related molecules. *EMBO Rep*, 3, 1029-34.
- FAINZILBER, M., SMIT, A. B., SYED, N. I., WILDERING, W. C., HERMANN, VAN DER SCHORS, R. C., JIMENEZ, C., LI, K. W., VAN MINNEN, J., BULLOCH, A. G., IBANEZ, C. F. & GERAERTS, W. P. 1996. CRNF, a molluscan neurotrophic factor that interacts with the p75 neurotrophin receptor. *Science*, 274, 1540-3.
- FEDEROFF, S., RICHARDSON, A. & MARTIN, G. M. 1996. *Protocols for Neural Cell Culture*.
- FERNANDES, F., POOLE, D. S., HOOVER, S., MIDDLETON, R., ANDREI, A. C., GERSTNER, J. & STRIKER, R. 2007. Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology*, 46, 1026-33.
- FERREIRA, P. A. & ORRY, A. 2012. From Drosophila to humans: reflections on the roles of the prolyl isomerases and chaperones, cyclophilins, in cell function and disease. *J Neurogenet*, 26, 132-43.
- FINKBEINER, S., TAVAZOIE, S. F., MALORATSKY, A., JACOBS, K. M., HARRIS, K. M. & GREENBERG, M. E. 1997. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19, 1031-47.
- FISCHER, G., BANG, H. & MECH, C. 1984. [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta*, 43, 1101-11.
- FRADE, J. M. & BARDE, Y. A. 1999. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development*, 126, 683-90.

- FRADE, J. M., RODRIGUEZ-TEBAR, A. & BARDE, Y. A. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, 383, 166-8.
- FREEMAN, B. C., TOFT, D. O. & MORIMOTO, R. I. 1996. Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science*, 274, 1718-20.
- FRIEDE, R. L. 1972. Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J Comp Neurol*, 144, 233-52.
- FRIEDMAN, J. & WEISSMAN, I. 1991. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, 66, 799-806.
- FROSTICK, S. P., YIN, Q. & KEMP, G. J. 1998. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 18, 397-405.
- FRYER, R. H., KAPLAN, D. R., FEINSTEIN, S. C., RADEKE, M. J., GRAYSON, D. R. & KROMER, L. F. 1996. Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol*, 374, 21-40.
- GALAT, A. 1993. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur J Biochem*, 216, 689-707.
- GARBAY, B., HEAPE, A. M., SARGUEIL, F. & CASSAGNE, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 61, 267-304.
- GEHLER, S., GALLO, G., VEIEN, E. & LETOURNEAU, P. C. 2004. p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 4363-72.
- GENTRY, J. J., RUTKOSKI, N. J., BURKE, T. L. & CARTER, B. D. 2004. A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem*, 279, 16646-56.
- GERARD, M., DELEERSNIJDER, A., DEMEULEMEESTER, J., DEBYSER, Z. & BAEKELANDT, V. 2011. Unraveling the role of peptidyl-prolyl isomerases in neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, 44, 13-27.
- GIJTENBEEK, J. M., VAN DEN BENT, M. J. & VECHE, C. J. 1999. Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J Neurol*, 246, 339-46.
- GOLD, B. G. 1997. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 15, 285-306.
- GOLD, B. G., ARMISTEAD, D. M. & WANG, M. S. 2005. Non-FK506-binding protein-12 neuroimmunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration. *J Neurosci Res*, 80, 56-65.
- GOTHEL, S. F., HERRLER, M. & MARAHIEL, M. A. 1996. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Bacillus subtilis*: identification of residues involved in cyclosporin A affinity and catalytic efficiency. *Biochemistry*, 35, 3636-40.
- GOTO, T., KINO, T., HATANAKA, H., NISHIYAMA, M., OKUHARA, M., KOHSAKA, M., AOKI, H. & IMANAKA, H. 1987. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*, 19, 4-8.
- GREENE, L. A. & TISCHLER, A. S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2424-8.
- GROTH, R. D., COICOU, L. G., MERMELSTEIN, P. G. & SEYBOLD, V. S. 2007. Neurotrophin activation of NFAT-dependent transcription contributes to the regulation of pro-nociceptive genes. *Journal of neurochemistry*, 102, 1162-74.
- HANDSCHUMACHER, R. E., HARDING, M. W., RICE, J., DRUGGE, R. J. & SPEICHER, D. W. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226, 544-7.
- HARDING, M. W., GALAT, A., UEHLING, D. E. & SCHREIBER, S. L. 1989. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 341, 758-60.
- HARLOW, E. & LANE, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*.
- HARRINGTON, A. W., ST HILLAIRE, C., ZWEIFEL, L. S., GLEBOVA, N. O., PHILIPPIDOU, P., HALEGOUA, S. & GINTY, D. D. 2011. Recruitment of actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signaling and survival. *Cell*, 146, 421-34.
- HASEGAWA, Y., YAMAGISHI, S., FUJITANI, M. & YAMASHITA, T. 2004. p75 neurotrophin receptor signaling in the nervous system. *Biotechnol Annu Rev*, 10, 123-49.

- HE, X. L. & GARCIA, K. C. 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science*, 304, 870-5.
- HEITMAN, J. & CULLEN, B. R. 2005. Cyclophilin B escorts the hepatitis C virus RNA polymerase: a viral achilles heel? *Mol Cell*, 19, 145-6.
- HELEKAR, S. A., CHAR, D., NEFF, S. & PATRICK, J. 1994. Prolyl isomerase requirement for the expression of functional homo-oligomeric ligand-gated ion channels. *Neuron*, 12, 179-89.
- HENNIG, L., CHRISTNER, C., KIPPING, M., SCHELBERT, B., RUCKNAGEL, K. P., GRABLEY, S., KULLERTZ, G. & FISCHER, G. 1998. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry*, 37, 5953-60.
- HIBINO, T., LOZA-COLL, M., MESSIER, C., MAJESKE, A. J., COHEN, A. H., TERWILLIGER, D. P., BUCKLEY, K. M., BROCKTON, V., NAIR, S. V., BERNEY, K., FUGMANN, S. D., ANDERSON, M. K., PANCER, Z., CAMERON, R. A., SMITH, L. C. & RAST, J. P. 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol*, 300, 349-65.
- HIROTA, Y., ACAR, N., TRANGUCH, S., BURNUM, K. E., XIE, H., KODAMA, A., OSUGA, Y., USTUNEL, I., FRIEDMAN, D. B., CAPRIOLI, R. M., DAIKOKU, T. & DEY, S. K. 2010. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 15577-82.
- HOLGADO-MADRUGA, M., MOSCATELLO, D. K., EMLET, D. R., DIETERICH, R. & WONG, A. J. 1997. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12419-24.
- HORIBE, T., YOSHO, C., OKADA, S., TSUKAMOTO, M., NAGAI, H., HAGIWARA, Y., TUJIMOTO, Y. & KIKUCHI, M. 2002. The chaperone activity of protein disulfide isomerase is affected by cyclophilin B and cyclosporin A in vitro. *J Biochem*, 132, 401-7.
- HORTON, A., LARAMEE, G., WYATT, S., SHIH, A., WINSLOW, J. & DAVIES, A. M. 1997. NGF binding to p75 enhances the sensitivity of sensory and sympathetic neurons to NGF at different stages of development. *Mol Cell Neurosci*, 10, 162-72.
- HUBER, L. J. & CHAO, M. V. 1995. A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J Neurosci Res*, 40, 557-63.
- IGLESIAS, T., CABRERA-POCH, N., MITCHELL, M. P., NAVEN, T. J., ROZENGURT, E. & SCHIAVO, G. 2000. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem*, 275, 40048-56.
- INOKI, K., OUYANG, H., LI, Y. & GUAN, K. L. 2005. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 79-100.
- IP, C. W., KRONER, A., KOHL, B., WESSIG, C. & MARTINI, R. 2009. Tacrolimus (FK506) causes disease aggravation in models for inherited peripheral myelinopathies. *Neurobiol Dis*, 33, 207-12.
- JAARO, H., BECK, G., CONTICELLO, S. G. & FAINZILBER, M. 2001. Evolving better brains: a need for neurotrophins? *Trends Neurosci*, 24, 79-85.
- JANSEN, G., MAATTANEN, P., DENISOV, A. Y., SCARFFE, L., SCHADE, B., BALGHI, H., DEJGAARD, K., CHEN, L. Y., MULLER, W. J., GEHRING, K. & THOMAS, D. Y. 2012. An interaction map of endoplasmic reticulum chaperones and foldases. *Mol Cell Proteomics*, 11, 710-23.
- JAYARAMAN, T., BRILLANTES, A. M., TIMERMAN, A. P., FLEISCHER, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & MARKS, A. R. 1992. FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *The Journal of biological chemistry*, 267, 9474-7.
- JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 6, 671-82.
- JESSEN, K. R. & MIRSKY, R. 2008. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*, 56, 1552-65.
- KANNING, K. C., HUDSON, M., AMIEUX, P. S., WILEY, J. C., BOTHWELL, M. & SCHECTERSON, L. C. 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci*, 23, 5425-36.
- KAO, S., JAISWAL, R. K., KOLCH, W. & LANDRETH, G. E. 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem*, 276, 18169-77.

- KAO, S. C., WU, H., XIE, J., CHANG, C. P., RANISH, J. A., GRAEF, I. A. & CRABTREE, G. R. 2009. Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science*, 323, 651-4.
- KHURSIGARA, G., ORLINICK, J. R. & CHAO, M. V. 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem*, 274, 2597-600.
- KIM, S. H., LESSNER, S. M., SAKURAI, Y. & GALIS, Z. S. 2004. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol*, 164, 1567-74.
- KINO, T., HATANAKA, H., MIYATA, S., INAMURA, N., NISHIYAMA, M., YAJIMA, T., GOTO, T., OKUHARA, M., KOHSAKA, M., AOKI, H. & ET AL. 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)*, 40, 1256-65.
- KLAPPA, P., FREEDMAN, R. B. & ZIMMERMANN, R. 1995. Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur J Biochem*, 232, 755-64.
- KLEIN, R., CONWAY, D., PARADA, L. F. & BARBACID, M. 1990. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*, 61, 647-56.
- KRAJEWSKA, M., KRAJEWSKI, S., ZAPATA, J. M., VAN ARSDALE, T., GASCOYNE, R. D., BERERN, K., MCFADDEN, D., SHABAIK, A., HUGH, J., REYNOLDS, A., CLEVINGER, C. V. & REED, J. C. 1998. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol*, 152, 1549-61.
- KRUSE, M., BRUNKE, M., ESCHER, A., SZALAY, A. A., TROPSCHUG, M. & ZIMMERMANN, R. 1995. Enzyme assembly after de novo synthesis in rabbit reticulocyte lysate involves molecular chaperones and immunophilins. *J Biol Chem*, 270, 2588-94.
- KRUTTGEN, A., MOLLER, J. C., HEYMACH, J. V., JR. & SHOOTER, E. M. 1998. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 9614-9.
- LAD, S. P., PETERSON, D. A., BRADSHAW, R. A. & NEET, K. E. 2003. Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor receptors. A role for the high affinity receptor site. *J Biol Chem*, 278, 24808-17.
- LANE-GUERMONPREZ, L., MOROT-GAUDRY-TALARMAIN, Y., MEUNIER, F. M., O'REGAN, S., ONOFRI, F., LE CAER, J. P. & BENFENATI, F. 2005. Synapsin associates with cyclophilin B in an ATP- and cyclosporin A-dependent manner. *J Neurochem*, 93, 1401-11.
- LATASA, M. J., ITUERO, M., MORAN-GONZALEZ, A., ARANDA, A. & COSGAYA, J. M. 2010. Retinoic acid regulates myelin formation in the peripheral nervous system. *Glia*, 58, 1451-64.
- LE HIR, M., SU, Q., WEBER, L., WOERLY, G., GRANELLI-PIPERNO, A. & RYFFEL, B. 1995. In situ detection of cyclosporin A: evidence for nuclear localization of cyclosporine and cyclophilins. *Lab Invest*, 73, 727-33.
- LEE, K. F., DAVIES, A. M. & JAENISCH, R. 1994. p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*, 120, 1027-33.
- LEE, T. H., PASTORINO, L. & LU, K. P. 2011. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 13, e21.
- LEVI-MONTALCINI, R., MEYER, H. & HAMBURGER, V. 1954. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res*, 14, 49-57.
- LINDSAY, R. M. 1988. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci*, 8, 2394-405.
- LIU, F. L., LIU, P. H., SHAO, H. W. & KUNG, F. L. 2006. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with FKBP12. *Biochemical and biophysical research communications*, 350, 472-7.
- LIU, J., FARMER, J. D., JR., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I. & SCHREIBER, S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 807-15.
- LOWRY, K. S., MURRAY, S. S., MCLEAN, C. A., TALMAN, P., MATHERS, S., LOPES, E. C. & CHEEMA, S. S. 2001. A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral*

- sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 2, 127-34.
- LU, B., PANG, P. T. & WOO, N. H. 2005. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 6, 603-14.
- LUBAN, J., BOSSOLT, K. L., FRANKE, E. K., KALPANA, G. V. & GOFF, S. P. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell*, 73, 1067-78.
- LUO, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, 1, 173-80.
- LYONS, W. E., STEINER, J. P., SNYDER, S. H. & DAWSON, T. M. 1995. Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *J Neurosci*, 15, 2985-94.
- MACPHEE, I. J. & BARKER, P. A. 1997. Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signaling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain. *J Biol Chem*, 272, 23547-51.
- MAHANTHAPPA, N. K., ANTON, E. S. & MATTHEW, W. D. 1996. Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*, 16, 4673-83.
- MAJDAN, M., LACHANCE, C., GLOSTER, A., ALOYZ, R., ZEINDLER, C., BAMJI, S., BHAKAR, A., BELLIVEAU, D., FAWCETT, J., MILLER, F. D. & BARKER, P. A. 1997. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17, 6988-98.
- MBYE, L. H., SINGH, I. N., CARRICO, K. M., SAATMAN, K. E. & HALL, E. D. 2009. Comparative neuroprotective effects of cyclosporin A and NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog, following traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29, 87-97.
- MCQUILLEN, P. S., DEFREITAS, M. F., ZADA, G. & SHATZ, C. J. 2002. A novel role for p75NTR in subplate growth cone complexity and visual thalamocortical innervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22, 3580-93.
- MEINTANIS, S., THOMAIDOU, D., JESSEN, K. R., MIRSKY, R. & MATSAS, R. 2001. The neuron-glia signal beta-neuregulin promotes Schwann cell motility via the MAPK pathway. *Glia*, 34, 39-51.
- MEIRER, R., BABUCCU, O., UNSAL, M., NAIR, D. R., GURUNLUOGLU, R., SKUGOR, B., MEIRER, B. & SIEMIONOW, M. 2002. Effect of chronic cyclosporine administration on peripheral nerve regeneration: a dose-response study. *Ann Plast Surg*, 49, 96-103.
- MI, S., LEE, X., SHAO, Z., THILL, G., JI, B., RELTON, J., LEVESQUE, M., ALLAIRE, N., PERRIN, S., SANDS, B., CROWELL, T., CATE, R. L., MCCOY, J. M. & PEPINSKY, R. B. 2004. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci*, 7, 221-8.
- MIDDLEMAS, D. S., LINDBERG, R. A. & HUNTER, T. 1991. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol*, 11, 143-53.
- MIKAMI, Y., ISHII, Y., WATANABE, N., SHIRAKAWA, T., SUZUKI, S., IRIE, S., ISOKAWA, K. & HONDA, M. J. 2011. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev*, 20, 901-13.
- MIKOL, V., KALLEN, J. & WALKINSHAW, M. D. 1994. X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex: comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 5183-6.
- MINICHIELLO, L., KORTE, M., WOLFER, D., KUHN, R., UNSICKER, K., CESTARI, V., ROSSI-ARNAUD, C., LIPP, H. P., BONHOEFFER, T. & KLEIN, R. 1999. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 24, 401-14.
- MORENO, H., NADAL, M., LEZNIK, E., SUGIMORI, M., LAX, I., SCHLESSINGER, J. & LLINAS, R. 1998. Nerve growth factor acutely reduces chemical transmission by means of postsynaptic TrkA-like receptors in squid giant synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14997-5002.
- MORRIS, J. K., LIN, W., HAUSER, C., MARCHUK, Y., GETMAN, D. & LEE, K. F. 1999. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron*, 23, 273-83.
- MOURI, A., NODA, Y., SHIMIZU, S., TSUJIMOTO, Y. & NABESHIMA, T. 2010. The role of cyclophilin D in learning and memory. *Hippocampus*, 20, 293-304.

- MUFSON, E. J. & KORDOWER, J. H. 1992. Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 569-73.
- MUKAI, J., HACHIYA, T., SHOJI-HOSHINO, S., KIMURA, M. T., NADANO, D., SUVANTO, P., HANAOKA, T., LI, Y., IRIE, S., GREENE, L. A. & SATO, T. A. 2000. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem*, 275, 17566-70.
- MURRAY, S. S., PEREZ, P., LEE, R., HEMPSTEAD, B. L. & CHAO, M. V. 2004. A novel p75 neurotrophin receptor-related protein, NRH2, regulates nerve growth factor binding to the TrkA receptor. *J Neurosci*, 24, 2742-9.
- NG, B. K., CHEN, L., MANDEMAKERS, W., COSGAYA, J. M. & CHAN, J. R. 2007. Anterograde transport and secretion of brain-derived neurotrophic factor along sensory axons promote Schwann cell myelination. *J Neurosci*, 27, 7597-603.
- NYE, S. H., SQUINTO, S. P., GLASS, D. J., STITT, T. N., HANTZOPOULOS, P., MACCHI, M. J., LINDSAY, N. S., IP, N. Y. & YANCOPOULOS, G. D. 1992. K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Mol Biol Cell*, 3, 677-86.
- NYKJAER, A., LEE, R., TENG, K. K., JANSEN, P., MADSEN, P., NIELSEN, M. S., JACOBSEN, C., KLIEMANNEL, M., SCHWARZ, E., WILLNOW, T. E., HEMPSTEAD, B. L. & PETERSEN, C. M. 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 427, 843-8.
- NYKJAER, A., WILLNOW, T. E. & PETERSEN, C. M. 2005. p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 49-57.
- OBERMEIER, A., BRADSHAW, R. A., SEEDORF, K., CHOIDAS, A., SCHLESSINGER, J. & ULLRICH, A. 1994. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *The EMBO journal*, 13, 1585-90.
- OH, Y., KIM, E. Y., KIM, Y., JIN, J., JIN, B. K., JAHNG, G. H., JUNG, M. H., PARK, C., KANG, I., HA, J. & CHOE, W. 2011. Neuroprotective effects of overexpressed cyclophilin B against Abeta-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Free Radic Biol Med*, 51, 905-20.
- OHIRA, K., KUMANOGOH, H., SAHARA, Y., HOMMA, K. J., HIRAI, H., NAKAMURA, S. & HAYASHI, M. 2005. A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci*, 25, 1343-53.
- PAESHUYSE, J., KAUL, A., DE CLERCQ, E., ROSENWIRTH, B., DUMONT, J. M., SCALFARO, P., BARTENSCHLAGER, R. & NEYTS, J. 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology*, 43, 761-70.
- PANG, P. T., TENG, H. K., ZAITSEV, E., WOO, N. T., SAKATA, K., ZHEN, S., TENG, K. K., YUNG, W. H., HEMPSTEAD, B. L. & LU, B. 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306, 487-91.
- PAP, T. 2005. Cyclophilins in rheumatoid arthritis--stepping into an undiscovered country? *Clin Immunol*, 116, 199-201.
- PARK, J. B., YIU, G., KANEKO, S., WANG, J., CHANG, J., HE, X. L., GARCIA, K. C. & HE, Z. 2005. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron*, 45, 345-51.
- PARKINSON, D. B., BHASKARAN, A., ARTHUR-FARRAJ, P., NOON, L. A., WOODHOO, A., LLOYD, A. C., FELTRI, M. L., WRABETZ, L., BEHRENS, A., MIRSKY, R. & JESSEN, K. R. 2008. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol*, 181, 625-37.
- POO, M. M. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 24-32.
- POSTIGO, A., CALELLA, A. M., FRITZSCH, B., KNIPPER, M., KATZ, D., EILERS, A., SCHIMMANG, T., LEWIN, G. R., KLEIN, R. & MINICHELLO, L. 2002. Distinct requirements for TrkB and TrkC signaling in target innervation by sensory neurons. *Genes Dev*, 16, 633-45.
- PRICE, E. R., JIN, M., LIM, D., PATI, S., WALSH, C. T. & MCKEON, F. D. 1994. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3931-5.
- PRICE, E. R., ZYDOWSKY, L. D., JIN, M. J., BAKER, C. H., MCKEON, F. D. & WALSH, C. T. 1991. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1903-7.



- QUARLES, R. H. 2007. Myelin-associated glycoprotein (MAG): past, present and beyond. *J Neurochem*, 100, 1431-48.
- RADEKE, M. J., MISKO, T. P., HSU, C., HERZENBERG, L. A. & SHOOTER, E. M. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*, 325, 593-7.
- RAO, A., LUO, C. & HOGAN, P. G. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15, 707-47.
- REICHARDT, L. F. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361, 1545-64.
- ROBERTSON, A. J., CROCE, J., CARBONNEAU, S., VORONINA, E., MIRANDA, E., MCCLAY, D. R. & COFFMAN, J. A. 2006. The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol*, 300, 321-34.
- ROSCH, H., SCHWEIGREITER, R., BONHOEFFER, T., BARDE, Y. A. & KORTE, M. 2005. The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7362-7.
- ROUX, P. P. & BARKER, P. A. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 67, 203-33.
- RYCZYNY, M. A. & CLEVINGER, C. V. 2002. The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6790-5.
- SABATINI, D. M., LAI, M. M. & SNYDER, S. H. 1997. Neural roles of immunophilins and their ligands. *Mol Neurobiol*, 15, 223-39.
- SALEHI, A. H., ROUX, P. P., KUBU, C. J., ZEINDLER, C., BHAKAR, A., TANNIS, L. L., VERDI, J. M. & BARKER, P. A. 2000. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*, 27, 279-88.
- SARIOLO, H. 2001. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1061-6.
- SARIOLO, H., SAARMA, M., SAINIO, K., ARUMAE, U., PALGI, J., VAAHTOKARI, A., THESLEFF, I. & KARAVANOV, A. 1991. Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve growth factor receptor. *Science*, 254, 571-3.
- SCHIENE-FISCHER, C., AUMÜLLER, T. & FISCHER, G. 2013. Peptide Bond cis/trans Isomerases: A Biocatalysis Perspective of Conformational Dynamics in Proteins. In: JACKSON, S. (ed.) *Molecular Chaperones*. Springer Berlin Heidelberg.
- SCHMIDT, A. & HALL, A. 2002a. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development*, 16, 1587-609.
- SCHMIDT, A. & HALL, A. 2002b. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 16, 1587-609.
- SCHREIBER, S. L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, 251, 283-7.
- SERAFEIM, A. & GORDON, J. 2001. The immune system gets nervous. *Current opinion in pharmacology*, 1, 398-403.
- SHAO, Z., BROWNING, J. L., LEE, X., SCOTT, M. L., SHULGA-MORSKAYA, S., ALLAIRE, N., THILL, G., LEVESQUE, M., SAH, D., MCCOY, J. M., MURRAY, B., JUNG, V., PEPINSKY, R. B. & MI, S. 2005. TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration. *Neuron*, 45, 353-9.
- SHERRY, B., YARLETT, N., STRUPP, A. & CERAMI, A. 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3511-5.
- SIEKIERKA, J. J., HUNG, S. H., POE, M., LIN, C. S. & SIGAL, N. H. 1989a. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341, 755-7.
- SIEKIERKA, J. J., STARUCH, M. J., HUNG, S. H. & SIGAL, N. H. 1989b. FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *J Immunol*, 143, 1580-3.
- SIEMIONOW, M. & SONMEZ, E. 2007. Nerve allograft transplantation: a review. *J Reconstr Microsurg*, 23, 511-20.
- SNYDER, S. H. & SABATINI, D. M. 1995. Immunophilins and the nervous system. *Nat Med*, 1, 32-7.

- SOBOTTKA, B., REINHARDT, D., BROCKHAUS, M., JACOBSEN, H. & METZGER, F. 2008. ProNGF inhibits NGF-mediated TrkA activation in PC12 cells. *J Neurochem*, 107, 1294-303.
- STAMNES, M. A., SHIEH, B. H., CHUMAN, L., HARRIS, G. L. & ZUKER, C. S. 1991. The cyclophilin homolog ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins. *Cell*, 65, 219-27.
- STEINER, J. P., CONNOLLY, M. A., VALENTINE, H. L., HAMILTON, G. S., DAWSON, T. M., HESTER, L. & SNYDER, S. H. 1997. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med*, 3, 421-8.
- STEINER, J. P., DAWSON, T. M., FOTUHI, M., GLATT, C. E., SNOWMAN, A. M., COHEN, N. & SNYDER, S. H. 1992. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature*, 358, 584-7.
- STUMPF, T., ZHANG, Q., HIRNET, D., LEWANDROWSKI, U., SICKMANN, A., WISSENBAACH, U., DORR, J., LOHR, C., DEITMER, J. W. & FECHER-TROST, C. 2008. The human TRPV6 channel protein is associated with cyclophilin B in human placenta. *The Journal of biological chemistry*, 283, 18086-98.
- SUGATA, H., MATSUO, K., NAKAGAWA, T., TAKAHASHI, M., MUKAI, H., ONO, Y., MAEDA, K., AKIYAMA, H. & KAWAMATA, T. 2009. A peptidyl-prolyl isomerase, FKBP12, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neuroscience letters*, 459, 96-9.
- SVAREN, J. & MEIJER, D. 2008. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia*, 56, 1541-51.
- TAKADERA, T., SAKAMOTO, Y., HIZUME, Y. & OHYASHIKI, T. 2007. Cyclosporine A- and FK506-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Biol Toxicol*, 23, 355-60.
- TENG, H. K., TENG, K. K., LEE, R., WRIGHT, S., TEVAR, S., ALMEIDA, R. D., KERMANI, P., TORKIN, R., CHEN, Z. Y., LEE, F. S., KRAEMER, R. T., NYKJAER, A. & HEMPSTEAD, B. L. 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 25, 5455-63.
- TESSAROLLO, L. 1998. Pleiotropic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 9, 125-37.
- TIMMERMAN, L. A., HEALY, J. I., HO, S. N., CHEN, L., GOODNOW, C. C. & CRABTREE, G. R. 1997. Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *Journal of immunology*, 159, 2735-40.
- TRUZZI, F., MARCONI, A., LOTTI, R., DALLAGLIO, K., FRENCH, L. E., HEMPSTEAD, B. L. & PINCELLI, C. 2008. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *The Journal of investigative dermatology*, 128, 2031-40.
- TUFFEREAU, C., BENEJEAN, J., BLONDEL, D., KIEFFER, B. & FLAMAND, A. 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J*, 17, 7250-9.
- UNDERWOOD, C. K. & COULSON, E. J. 2008. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1664-8.
- VAEGTER, C. B., JANSEN, P., FJORBACK, A. W., GLERUP, S., SKELDAL, S., KJOLBY, M., RICHNER, M., ERDMANN, B., NYENGAARD, J. R., TESSAROLLO, L., LEWIN, G. R., WILLNOW, T. E., CHAO, M. V. & NYKJAER, A. 2011. Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling. *Nat Neurosci*, 14, 54-61.
- VAN KESTEREN, R. E., FAINZILBER, M., HAUSER, G., VAN MINNEN, J., VREUGDENHIL, E., SMIT, A. B., IBANEZ, C. F., GERAERTS, W. P. & BULLOCH, A. G. 1998. Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J*, 17, 2534-42.
- VERDI, J. M., BIRREN, S. J., IBANEZ, C. F., PERSSON, H., KAPLAN, D. R., BENEDETTI, M., CHAO, M. V. & ANDERSON, D. J. 1994. p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron*, 12, 733-45.
- VESA, J., KRUTTGEN, A., COSGAYA, J. M. & SHOOTER, E. M. 2000a. Palmitoylation of the p75 neurotrophin receptor has no effect on its interaction with TrkA or on TrkA-mediated down-regulation of cell adhesion molecules. *J Neurosci Res*, 62, 225-33.
- VESA, J., KRUTTGEN, A. & SHOOTER, E. M. 2000b. p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *J Biol Chem*, 275, 24414-20.
- VILAR, M., CHARALAMPOPOULOS, I., KENCHAPPA, R. S., REVERSI, A., KLOS-APPLEQUIST, J. M., KARACA, E., SIMI, A., SPUCH, C., CHOI, S., FRIEDMAN, W. J., ERICSON, J., SCHIAVO,

- G., CARTER, B. D. & IBANEZ, C. F. 2009a. Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci*, 122, 3351-7.
- VILAR, M., CHARALAMPOPOULOS, I., KENCHAPPA, R. S., SIMI, A., KARACA, E., REVERSI, A., CHOI, S., BOTHWELL, M., MINGARRO, I., FRIEDMAN, W. J., SCHIAVO, G., BASTIAENS, P. I., VERVEER, P. J., CARTER, B. D. & IBANEZ, C. F. 2009b. Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, 62, 72-83.
- VOGEL, K. S., EL-AFANDI, M. & PARADA, L. F. 2000. Neurofibromin negatively regulates neurotrophin signaling through p21ras in embryonic sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 15, 398-407.
- VON SCHACK, D., CASADEMUNT, E., SCHWEIGREITER, R., MEYER, M., BIBEL, M. & DECHANT, G. 2001. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nature neuroscience*, 4, 977-8.
- WANG, K. C., KIM, J. A., SIVASANKARAN, R., SEGAL, R. & HE, Z. 2002. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*, 420, 74-8.
- WANG, P. & HEITMAN, J. 2005. The cyclophilins. *Genome Biol*, 6, 226.
- WATASHI, K., ISHII, N., HIJIKATA, M., INOUE, D., MURATA, T., MIYANARI, Y. & SHIMOTOHNO, K. 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*, 19, 111-22.
- WATASHI, K. & SHIMOTOHNO, K. 2007a. Cyclophilin and viruses: cyclophilin as a cofactor for viral infection and possible anti-viral target. *Drug Target Insights*, 2, 9-18.
- WATASHI, K. & SHIMOTOHNO, K. 2007b. Chemical genetics approach to hepatitis C virus replication: cyclophilin as a target for anti-hepatitis C virus strategy. *Rev Med Virol*, 17, 245-52.
- WEHRMAN, T., HE, X., RAAB, B., DUKIPATTI, A., BLAU, H. & GARCIA, K. C. 2007. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron*, 53, 25-38.
- WILSON, K. H. 2009. The genome sequence of the protostome *Daphnia pulex* encodes respective orthologues of a neurotrophin, a Trk and a p75NTR: evolution of neurotrophin signaling components and related proteins in the bilateria. *BMC Evol Biol*, 9, 243.
- WONG, B. R., BESSER, D., KIM, N., ARRON, J. R., VOLOGODSKAIA, M., HANAFUSA, H. & CHOI, Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*, 4, 1041-9.
- WONG, S. T., HENLEY, J. R., KANNING, K. C., HUANG, K. H., BOTHWELL, M. & POO, M. M. 2002. A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*, 5, 1302-8.
- WOO, N. H., TENG, H. K., SIAO, C. J., CHIARUTTINI, C., PANG, P. T., MILNER, T. A., HEMPSTEAD, B. L. & LU, B. 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature neuroscience*, 8, 1069-77.
- WU, C., LAI, C. F. & MOBLEY, W. C. 2001. Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci*, 21, 5406-16.
- XIAO, J., WONG, A. W., WILLINGHAM, M. M., KAASINEN, S. K., HENDRY, I. A., HOWITT, J., PUTZ, U., BARRETT, G. L., KILPATRICK, T. J. & MURRAY, S. S. 2009. BDNF exerts contrasting effects on peripheral myelination of NGF-dependent and BDNF-dependent DRG neurons. *J Neurosci*, 29, 4016-22.
- YAMASHITA, T., TUCKER, K. L. & BARDE, Y. A. 1999. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24, 585-93.
- YAMAUCHI, J., CHAN, J. R., MIYAMOTO, Y., TSUJIMOTO, G. & SHOOTER, E. M. 2005. The neurotrophin-3 receptor TrkC directly phosphorylates and activates the nucleotide exchange factor Dbs to enhance Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5198-203.
- YAMAUCHI, J., CHAN, J. R. & SHOOTER, E. M. 2003. Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14421-6.
- YAMAUCHI, J., CHAN, J. R. & SHOOTER, E. M. 2004. Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 8774-9.

- ZACCARO, M. C., IVANISEVIC, L., PEREZ, P., MEAKIN, S. O. & SARAGOV, H. U. 2001. p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem*, 276, 31023-9.
- ZANAZZI, G., EINHEBER, S., WESTREICH, R., HANNOCKS, M. J., BEDELL-HOGAN, D., MARCHIONNI, M. A. & SALZER, J. L. 2001. Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination. *J Cell Biol*, 152, 1289-99.

# *Anexos*

# Retinoic Acid Regulates Myelin Formation in the Peripheral Nervous System

MARIA-JESUS LATASA, MARIO ITUERO, ALEJANDRA MORAN-GONZALEZ, ANA ARANDA,  
AND JOSE MIGUEL COSGAYA\*

Department of Endocrine and Nervous System Physiopathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain

## KEY WORDS

Schwann cell; DRG neuron; Krox-20; sciatic nerve

## ABSTRACT

Understanding the mechanisms that control myelin formation is essential for the development of demyelinating diseases treatments. *All-trans*-retinoic acid (RA) plays an essential role during the development of the nervous system as a potent regulator of morphogenesis, cell growth, and differentiation. In this study, we show that RA is also a potent inhibitor of peripheral nervous system (PNS) myelination. RA acts through its binding to RA receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR), two members of the superfamily of nuclear receptors that act as ligand-dependent transcription factors. Schwann cells (SCs) express all retinoid receptors during the relevant stages of myelin formation. Through the activation of RXR, RA produces an upregulation of Krox20, a SC-specific regulatory transcription factor that plays a central role during myelination. Krox20 upregulation translates into *Mbp* and *Mpz* overexpression, therefore blocking myelin formation. This increase in myelin protein expression is accompanied by the induction of an adaptive ER stress response. At the same time, through a RAR-dependent mechanism, RA downregulates myelin-associated glycoprotein, which also contributes to the dysmyelinating effect of the retinoid. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

The myelin sheath is a specialized structure of the plasma membrane from oligodendrocytes in the central nervous system (CNS) and Schwann cells (SCs) in the peripheral nervous system (PNS). Its main function is to maximize the efficiency and velocity of action potentials transmission. The mechanisms that control myelin formation have received considerable attention due to the devastating effects of human diseases linked to its malfunction, such as multiple sclerosis in the CNS or Charcot-Marie-Tooth and Guillain-Barré syndromes in the PNS.

The formation of the PNS myelin sheath depends on a complex series of concerted interactions between SCs and the axons to be myelinated (Garbay et al., 2000). First, the neurons promote SCs proliferation and migration along their axons (proliferation stage). Then, SCs elongate and ensheat the axons (premyelination stage) and finally, after the basal lamina is formed, the axons

instruct the SCs to start wrapping them to form a mature myelin sheath (myelination stage).

Besides the extrinsic regulatory stimuli, myelination is under the control of an intrinsic genetic program governed by a network of transcription factors coordinating the execution of the entire myelination process and the expression and sorting of the different proteins necessary to assemble the myelin sheath (Svaren and Meijer, 2008).

Retinoic acid (RA) and other retinoids are potent regulators of morphogenesis, cell growth, and differentiation in the nervous system, where their abundance is very high (Maden, 2007). RA induces neuronal differentiation of several cell types including embryonic and adult stem cells, dorsal root ganglia neurons (DRGNs), neuroblastoma, and PC12 cells (Bain et al., 1995; Cañón et al., 2004; Corcoran and Maden, 1999; Cosgaya et al., 1996, 1997; Haussler et al., 1983; Scheibe et al., 1991). Although most of the studies on RA in the nervous system relate to its function as a morphogen or differentiating factor in the CNS, RA signaling also occurs in the PNS. In the sciatic nerve, all the required components of the RA signaling pathway (synthesizing enzymes, cellular binding proteins, and receptors) are present, primarily on SCs (Mey et al., 2007). Moreover, local production and activation of RA in SCs are greatly increased during nerve regeneration after injury (Zhelyaznik and Mey, 2006; Zhelyaznik et al., 2003), suggesting that RA could play a role in SC physiology during development or in pathological conditions during Wallerian degeneration and remyelination.

Despite the fact that retinoids play a key role during CNS myelination as inhibitors of oligodendrocyte maturation (Barres et al., 1994; Noll and Miller, 1994) and that the responsiveness of DRGNs and SCs to retinoids has been previously documented, their involvement on PNS

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsors: Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, Comunidad de Madrid-CSIC, Fundación Mutua Madrileña; Grant sponsor: European grant CRESCENDO; Grant number: FP-018652; Grant sponsor: Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, CSIC, Venezuelan Fonacit.

\*Correspondence to: Jose Miguel Cosgaya, Department of Endocrine and Nervous System Physiopathology, Instituto de Investigaciones Biomédicas—CSIC, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain. E-mail: jmcosgaya@iib.uam.es

Received 11 November 2009; Accepted 22 April 2010

DOI 10.1002/glia.21020

Published online 26 May 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

myelination had not been previously explored. We have analyzed the effect of RA on myelin formation both *in vitro* by using a myelinating DRGN/SC coculture system as well as *in vivo* during the development of the sciatic nerve. Our studies show that RA is a strong inhibitor of PNS myelin formation through two different mechanisms, one involving retinoid X receptors (RXR) binding and Krox20 up-regulation, and another one that implies myelin-associated glycoprotein (MAG) downregulation through its binding to RA receptors (RAR).

## MATERIALS AND METHODS

### Rat DRGN/SC Cocultures

Purified DRGN and SC cultures were prepared by using methods previously described (Chan et al., 2001). In short, neuronal cultures were established from DRGs obtained from Wistar rat embryos at 15 days of gestation from our animal facility. DRGNs were dissociated and plated onto collagen-coated coverslips. Nonneuronal cells were eliminated by cycling (three 2-day cycles) with a fluorodeoxyuridine-containing medium (10  $\mu$ M). NGF-dependent neurons were then maintained for 1 week in medium consisting of 10% fetal bovine serum (FBS) in high-glucose minimum essential medium (MEM) and 100 ng/mL of NGF.

SCs were isolated from the sciatic nerves of 4-day-old rat pups as previously described (Chan et al., 2001). SCs were purified by using cytosine arabinoside and Thy-1.1 antibody (Sigma)-mediated lysis of the fibroblasts. Approximately 100,000 purified SCs were then seeded onto 3-week-old purified neuronal cultures of  $\approx$ 50,000 cells. On contact with the axons, SCs proliferated rapidly until the axons were fully populated. When proliferation ceased, SCs began to elongate and ensheath the axons (premyelination stage). During this stage, media were progressively changed to media containing 10% newborn bovine serum depleted of retinoids. At this time ( $\approx$ 7 days after seeding), once the SCs have ceased to proliferate, because they have completely populated the cultures and already have established a one-to-one relationship with the axons, the cocultures were induced to myelinate (myelination stage) by the addition of ascorbic acid (50  $\mu$ g/mL), which is necessary for the formation of the basal lamina, an absolute requirement for myelin formation. This allows us to discriminate between the proliferation/premyelination stages and the properly called myelination stage.

Treatments with the different retinoids (all at 1  $\mu$ M unless otherwise indicated) were initiated at the time of ascorbic acid addition (considered always as day 0 in all the experiments) and replenished with every feeding, together with new ascorbic acid, every 2–3 days.

### Mouse DRGN/SC Cocultures

Dissociated explants were established using E13 mice (Swiss strain from our animal facility) as previously described (Cosgaya et al., 2002). Essentially, the DRGs

were collected and dissociated using 0.25% trypsin and trituration. Cells were dispersed and plated onto collagen-coated coverslips. The dissociated explants were maintained in MEM medium-containing 10% FBS and NGF. Axonal processes and endogenous SCs were allowed to grow and establish themselves for  $\sim$ 7 days. The SCs ensheathed the axons in a similar manner to that observed in purified rat cocultures. After two progressive changes to retinoid-depleted media, ascorbic acid was added to initiate myelin formation.

### Rat SC Cultures

SCs were isolated and purified as previously indicated. After cytosine arabinoside and Thy-1.1 purification, SCs cultures were plated in poly-L-lysine-coated plates and expanded in 10% heat-inactivated FBS-containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), in the continuous presence of 2  $\mu$ M forskolin and 60  $\mu$ g/mL bovine pituitary extract. Cultures were always used within less than four passages, and all experiments were repeated with SCs from different preparations. For experiments, freshly seeded SCs were allowed to attach O.N. in regular media, changed to DMEM containing 10% newborn bovine serum depleted of retinoids, 2  $\mu$ M forskolin (Calbiochem), and 60  $\mu$ g/mL bovine pituitary extract (Gibco), and allowed to adapt to the new conditions for at least 24 h before adding the different treatments.

### Injections in Mouse Sciatic Nerve

*All-trans*-RA (5 nmol in 5  $\mu$ L) was injected s.c., starting from the caudal portion of the greater trochanter region and running parallel along the sciatic nerve as previously described (Chan et al., 2001). The contralateral leg served as a control with the injection of vehicle (5% ethanol in saline). Injections were performed on newborn mouse pups (Swiss strain from our animal facility) the first day after they are born (P1), and the sciatic nerves were isolated and processed 72 h later. Nerves used for electron microscopy were trimmed, and incisions were made at the flexure of the greater trochanter. In total, 29 animals were analyzed after injection with RA. As a control, the effect of the ethanol solution versus saline was analyzed in eight animals with no obvious differences.

### Western Blot Analysis

Samples from SC/neuronal cocultures and sciatic nerves were prepared for Western blot analysis by homogenization in radioimmunoprecipitation assay buffer [PBS with 1% Nonidet P-40/0.5% deoxycholate/0.1% sodium dodecyl sulfate/1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride/complete protease inhibitor tablets (Roche)] followed by high-speed centrifugation. Protein determination was made by using the BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce).



Equivalent amounts of total protein extract from each sample were electrophoretically separated on 10–15% discontinuous acrylamide gels, transferred to pure nitrocellulose membranes (PROTRAN BA85, Schleicher and Schuell, 0.45  $\mu$ m), and the equal loading and transfer of the samples was monitored by Ponceau staining of the membranes. The different proteins were visualized by incubation with specific antibodies overnight at 4°C, followed by incubation with a secondary antibody for 2 h at room temperature. The mouse monoclonal anti-MAG (Chemicon) was used at a concentration of 2.5  $\mu$ g/mL (under nonreducing conditions); the mouse monoclonal anti-P<sub>0</sub> antibody (Astexx, Graz, Austria) was used at a dilution of 1:5,000; the rabbit polyclonal antibodies against Krox20 (EGR2; Aviva Systems Biology), BiP (Abcam), activated caspase-3 (Cell Signaling), and anti-Neurofilament 200 (Sigma) were used at a dilution of 1:1,000.  $\beta$ -Actin was used as a loading control with a HRP-conjugated rabbit anti- $\beta$ -actin (Sigma) at 1:10,000. Secondary HRP-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used at a dilution of 1:10,000, except for BiP and activated caspase-3 antibodies, with which a 1:2,000 dilution was used. The blots were developed by chemiluminescence (Immun-Star<sup>TM</sup> HRP Chemiluminescent Kit, Bio-Rad) as indicated by the manufacturer. In some instances, IRDye<sup>®</sup>-conjugated secondary antibodies (Li-Cor) were used at a 1:15,000 dilution, and the blots were quantitated in an Odyssey scanner (Li-Cor). Blots were quantitated with the imaging and analysis software ImageJ 1.42d (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was performed as described (Chan et al., 2001). In short, cocultures were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized, and blocked by incubation with 20% normal goat serum. Primary antibodies included the rabbit polyclonal anti-MBP antibody (Chemicon) used at a dilution of 1:500, rabbit polyclonal anti-BiP (Abcam) at 1:1000, rabbit polyclonal anti-Krox20 at 1:500, and the mouse monoclonal anti-MAG (Chemicon) at a concentration of 2.5  $\mu$ g/mL. The Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 or Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 secondary antibodies (Invitrogen) were used at a dilution of 1:2,000. Samples were mounted in Prolong<sup>®</sup> Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen), and fluorescence microscopy was captured with a Nikon Ds-Qi1Mc camera coupled to a Nikon Eclipse 90i microscope. In some instances, samples were subjected to confocal microscopy with a Leica TCS SP5. Images were stacked, and maximum intensity projections along the Z-axis were made with ImageJ 1.42d.

In all instances, pictures from the same experiment were optimized for the controls, and the rest of the pictures were taken at the same exposure times.

### Sudan Black Staining

After 4% paraformaldehyde fixation, cultures were washed with PBS and postfixed for 1 h with 0.1% os-

mium tetroxide. After three washes with PBS, the cultures were dehydrated with an ethanol series (25, 50, and 70%) for 10 min each and incubated for 2 h in a 0.5% Sudan black solution in 70% ethanol, washed with 70% ethanol, and rehydrated in PBS. Pictures were captured with a Nikon Digital Sight DS-5M camera coupled to a Nikon Eclipse TS100 microscope.

### Electron Microscopy

Electron microscopy was performed by the Electron Microscopy Facility in the SIDI from the School of Medicine (Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain). Processing of the sciatic nerve was accomplished by fixation in 2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde solution in PBS, followed by postfixation in 1% OsO<sub>4</sub> and staining with 1% aqueous uranyl acetate. Analysis of the samples was performed with the ImageJ 1.40e (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The number of individual axons analyzed was 447 for the RA-treated nerves and 415 for the contralateral control nerves. All measurements were performed in a double-blind fashion. Pictures were taken by a technician, and measurements were performed by another technician, neither of whom knew about the identity of the samples.

### Real-Time Quantitative PCR

mRNA was extracted using TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma) and quantitated with a Nanodrop<sup>TM</sup> spectrophotometer (Thermo Scientific). One microgram of total mRNA from each sample was reverse transcribed with iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) and the relative levels of the genes of interest determined by quantitative real-time PCR using Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Stratagene) in a Mx3005P instrument (Stratagene). All gene expression levels were normalized to the housekeeping gene 18S rRNA.

The primers were designed by using the MacVector suite (<http://www.macvector.com/>) coupled with Amplify software (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>). Primers were designed from common sequences in the rat and mouse genes and, when possible (multiexonic genes), spanning two consecutive exons to avoid interference from possible genomic DNA contamination. For monoexonic genes, a DNase treatment of the samples was performed before cDNA synthesis. In all cases, primers were first tested by conventional RT-PCR to produce a single amplicon of the correct size, followed by Q-RT-PCR to avoid primer-dimer artifacts and ensure a lineal range of quantitation. The primers used are indicated in Supporting Information Table 1.

## RESULTS

### RA Inhibits Myelin Formation in the PNS

Because of the important role that retinoids play as regulators of myelin formation in the CNS (Barres



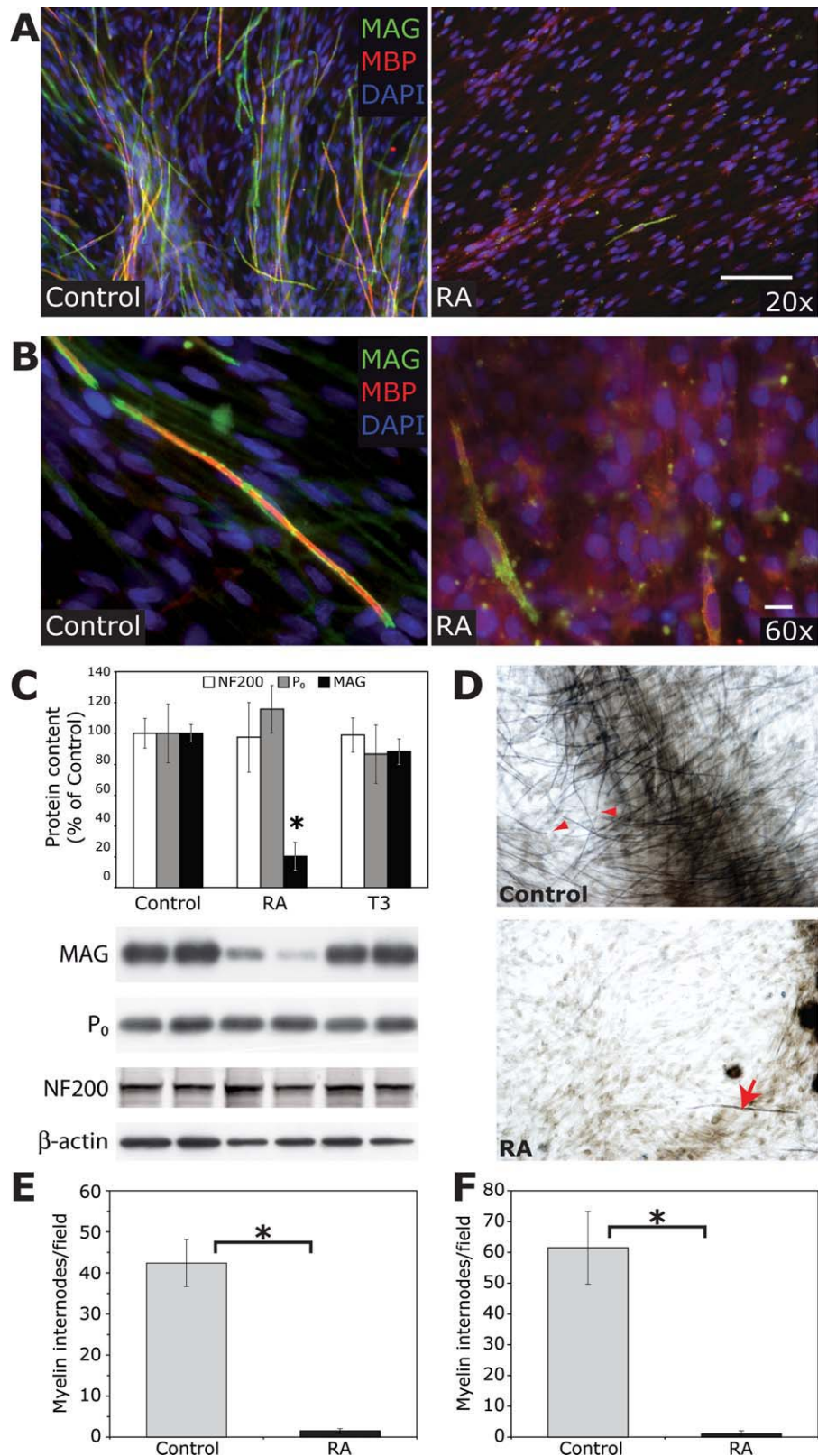


Fig. 1. RA inhibits myelin formation in SC/DRGN cocultures. Rat-purified cocultures were induced to myelinate for 7 days after ascorbic acid addition in the presence or absence of RA, and the amount of myelin was determined by several methods. **A:** Mature myelin internodes were almost absent in the presence of RA by immunocytochemistry. Scale bar, 100  $\mu$ m. **B:** Higher magnification shows accumulation of myelin proteins in nonmyelinating SC without internode formation. Scale bar, 10  $\mu$ m. **C:** RA inhibits MAG protein accumulation without affecting P<sub>0</sub> nor neurofilament-H (NF200) protein levels in myelinating SC/DRGN cocultures while T3 does not have any effect. Top panels show the quantification of at least two independent experiments performed in duplicate. The results

are shown as the mean value  $\pm$  SD relative to control cocultures. \* $P < 0.001$  relative to control by Student's  $t$ -test. **D:** RA inhibits myelin internodes formation as shown by Sudan black staining. The arrowhead in control cultures points to a Node of Ranvier and the arrow shows an isolated myelin internode in RA-treated cocultures. **E,F:** The number of myelin internodes after treatment with RA was quantified from at least three different fields for each condition. The myelin internodes were visualized by (E) immunocytochemistry and (F) Sudan black staining. The results are shown as the mean value  $\pm$  SEM. \* $P < 0.001$  relative to control by Student's  $t$ -test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

et al., 1994) and that their receptors are expressed by peripheral neurons and SCs, we sought to analyze their influence on the myelination process in the PNS, by using a coculture system with DRGNs and SCs. The addition of 1  $\mu$ M RA produced a strong inhibition of myelin formation, visualized 7 days after ascorbic acid addition by immunocytochemistry against the myelin proteins MAG and MBP (Fig. 1A,B). Although most of the internodes in the control cocultures presented a mature aspect with strong MBP staining and MAG already restricted to paranodal regions and Schmidt–Lanterman incisures (Trapp and Quarles, 1982), the few myelin internodes that could be observed in the presence of RA were mostly immature, presenting shorter internodes that were essentially MBP-negative (or with faint staining) and diffuse MAG staining along the whole SC body. In the absence of ascorbate when no basal lamina was formed and no myelin internodes were present, MBP immunoreactivity was practically not detectable in SCs while MAG was just about visible. RA abolished the barely detectable MAG immunostaining while induced an MBP upregulation (Supp. Info. Fig. 1).

To further investigate the inhibition of myelin formation by retinoids, the accumulation of the myelin protein MAG on purified rat myelinating DRGN/SC cocultures was analyzed by western blot. RA produced a strong and statistically significant decrease on MAG accumulation, whereas the thyroid hormone T3 (an agent that functions through another member of the superfamily of nuclear receptors and also affects CNS myelin formation) had no effect (Fig. 1C). Surprisingly, despite being the major myelin protein, P<sub>0</sub> accumulation was not diminished by RA treatment. The same effect was also observed in mouse-dissociated DRG myelinating cultures, with a strong reduction in MAG accumulation after RA treatment but without affecting P<sub>0</sub> levels (Supp. Info. Fig. 2). To ensure that RA produced a decrease in myelin formation, despite the observed normal levels of the major myelin protein P<sub>0</sub>, purified rat cocultures were analyzed with Sudan black staining. Similarly to what was observed by immunocytochemistry analysis, RA blocked myelin internode formation almost completely (Fig. 1D). Both by immunocytochemistry and by Sudan black staining, treatment with RA produced a >95% decrease in the number of myelin internodes present in the cocultures compared to what could be found in control conditions (Fig. 1E,F, respectively).

The effect of RA on myelin formation is not the manifestation of any deleterial effect of the hormone on the viability or integrity of the cocultures. Levels of neurofilament-H were maintained unchanged after treatment with the factor (Fig. 1C), and no apparent differences could be observed on the axonal mess (Supp. Info. Fig. 3A). On the other hand, no differences could be observed on the viability of isolated SCs or cocultures. In both, control and RA-treated cocultures, the number of apoptotic cells as determined by examination of nuclear integrity, appearance, and shape was almost negli-

gible (see Fig. 1), and no increase in activated caspase-3 could be seen after RA-treatment, neither in isolated SC cultures (Supp. Info. Fig. 3B) nor in myelinating cocultures (Supp. Info. Fig. 3C). All these results agree with the previous reports in the literature, indicating that RA increases the survival and differentiation of DRG neurons (Corcoran and Maden, 1999).

The ability of RA to inhibit myelin formation is not dependent on basal lamina formation, because when RA was added 2 or 4 days after myelination was induced with ascorbic acid, the hormone was still able to inhibit myelin formation but with decreasing efficiency (Supp. Info. Fig. 4).

### Regulation of Myelin Formation by RA in the Developing Sciatic Nerve

The effect of RA on the myelination process was also analyzed during the development of the sciatic nerve in newborn mice. One-day-old mouse pups were subcutaneously injected with the retinoid in close proximity to their sciatic nerves, followed by their extraction and processing 72-h afterward. Contralateral legs were injected with an equivalent volume of the vehicle and provided the specific control for each animal. RA was found to significantly reduce the expression of MAG by  $\approx$ 40%, whereas it had no effect on P<sub>0</sub> protein levels (Fig. 2A,B).

To analyze the effect of RA on the formation of the myelin sheath at the ultrastructural level, newborn mice were injected as previously, their sciatic nerves were collected, and the thickness of the myelin sheaths was determined by electron microscopy (Fig. 2C). Myelin thickness from RA-treated nerves displayed a small but statistically significant difference (7% decrease,  $P < 0.01$ , with 447 measurements for the RA-treated nerves and 415 for the contralateral control nerves) when compared with their contralateral controls. The difference was more evident when the distribution of myelin thickness was analyzed. RA-treated nerves presented a lower number of thick myelin sheaths and, conversely, a larger percentage of axons with thin myelin (Fig. 2D). This is especially clear for the thickest myelin sheaths ( $>0.6 \mu$ m) in which there was a statistically significant 60% reduction in the percentage of fibers falling into that range from control and RA-treated nerves (3.2% vs. 1.3%, respectively).

Altogether, these results demonstrate that RA regulates MAG abundance and myelin formation during the development of the sciatic nerve.

### Expression Profiles of Retinoid Receptors in the PNS During Myelination

RA can bind with very high affinity to RAR and also, although with a lower affinity, to RXR. Both receptor types present several isoforms that are codified by three separate genes for each receptor type ( $-\alpha$ ,  $-\beta$ , and  $-\gamma$ ). To investigate the participation of the different retinoid

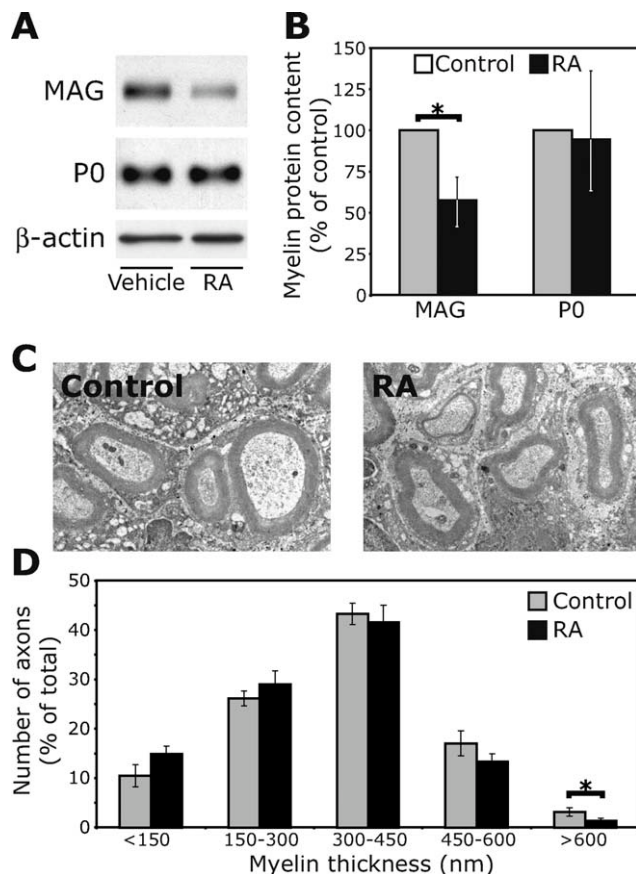


Fig. 2. RA influences myelin formation during development of the mouse sciatic nerve. Newborn mice (P1) were injected s.c. with RA, whereas the contralateral legs were injected with vehicle alone as a control for each mice. Three days later (P4), the sciatic nerves were isolated and processed. **A:** RA inhibits MAG protein accumulation without affecting P<sub>0</sub> protein levels. **B:** Quantification of the effect of RA on MAG and P<sub>0</sub> myelin proteins accumulation. The results are shown as the median  $\pm$  interquartile range relative to the contralateral leg injected with vehicle alone. \* $P < 0.01$  by Student's *t*-test. **C,D:** RA decreases myelin thickness. P1 newborn mice were injected with RA while their contralateral legs served as controls with the injection of vehicle alone. Three days later, their sciatic nerves were removed and processed for electron microscopy studies. **C:** Representative electron micrographs from RA-treated and its contralateral control nerve. **D:** The thickness of the myelin sheath was determined by measuring its size from individual myelinated axons. The distribution is shown as the mean  $\pm$  SEM of the percentage of myelinated axons that falls within the indicated range in size. \* $P < 0.05$  by Student's *t*-test.

receptors in the myelination process, their expression levels were examined in myelinating SC/neuronal cocultures. The major myelin genes *Mag*, *Mpz*, and *Mbp* mRNAs were expressed at low levels in isolated SCs or premyelinating cocultures (Fig. 3A). Upon ascorbic acid addition, their levels were rapidly increased, indicative of active myelin formation (Fig. 3B). The first gene to be activated was *Mag*, in agreement with being an early myelin marker, followed by the late markers *Mbp* and *Mpz*.

Compared to adult rat brain (which expresses relatively high levels of all retinoid receptors), DRGNs expressed small amounts of all six receptors, while isolated SCs presented higher levels for most of them, comparable or even greater than the levels observed in adult

brain, specially RAR- $\alpha$  and - $\gamma$  (Fig. 3C,D). DRGN/SC cocultures expressed even higher levels of all retinoid receptors. Especially interesting is RXR- $\gamma$ , which was practically undetectable in neurons, presented similar levels to brain in SCs and was highly upregulated in the premyelinating cocultures. Compared to DRGNs alone, we observed an increase in all retinoid receptors during the proliferation/premyelination stages, probably indicative of the increase in SCs numbers in the cocultures, reaching a maximum around the time of ascorbic acid addition (when proliferation ceases) and maintaining a high level of expression during the whole myelination process (Fig. 3E,F).

We also analyzed the presence of retinoid receptors during mouse sciatic nerve development *in vivo* by Q-RT-PCR. Myelin protein synthesis and deposition in the developing sciatic nerve occur primarily during the first 2 weeks after birth (Garbay et al., 2000). Concurrently, *Mag*, *Mbp*, and *Mpz* mRNA levels increased from post-natal day 1, reaching a maximum between  $\approx 8$  and 12 days of age and decreasing afterward by the end of the second week of age (Supp. Info. Fig. 5A). The three RARs were present in the sciatic nerve during the whole myelination process at comparable levels to adult brain (Fig. 3C), whereas RXRs were also present although at much lower levels than in adult brain (Fig. 3E). All six receptors mRNAs started to decline during myelination *in vivo* but still remained at relatively high levels during the initial part of the process (Supp. Info. Fig. 5B,C).

### Retinoids Influence Myelin Internode Formation Through RXR and RAR

Because both receptor types are present during myelination, both *in vivo* and *in vitro*, we resorted to use synthetic retinoids to ascertain which of them mediates the effects of RA. TTNPB is a synthetic retinoid that specifically binds only to RA receptors (RAR), even with higher affinity than natural retinoids (Aström et al., 1990), while the synthetic retinoid LG100268, conversely, only binds to and activates retinoid X receptors (RXR) (Boehm et al., 1995). After verifying that the different compounds were able to elicit the proper response in SCs (Supp. Info. Fig. 6), myelinating DRGN/SC cocultures were treated with the different hormones, and subsequent myelin internode formation was analyzed by immunocytochemistry (Fig. 4A). Extensive internode formation was obtained in control cocultures, whilst RA produced an almost complete inhibition of myelin formation. In the presence of RA, the number of myelin internodes found was less than 3% of that found in control conditions (Fig. 4B). Similarly to RA, the natural retinoid 9-*cis*-RA (which binds with similar affinity to RAR and RXR) also blocked myelin formation (data not shown). Unexpectedly, TTNPB was significantly less potent than the natural retinoids inhibiting myelin formation, although it could still inhibit myelin formation by 75%. Finally, the retinoid LG-100268 was nearly as



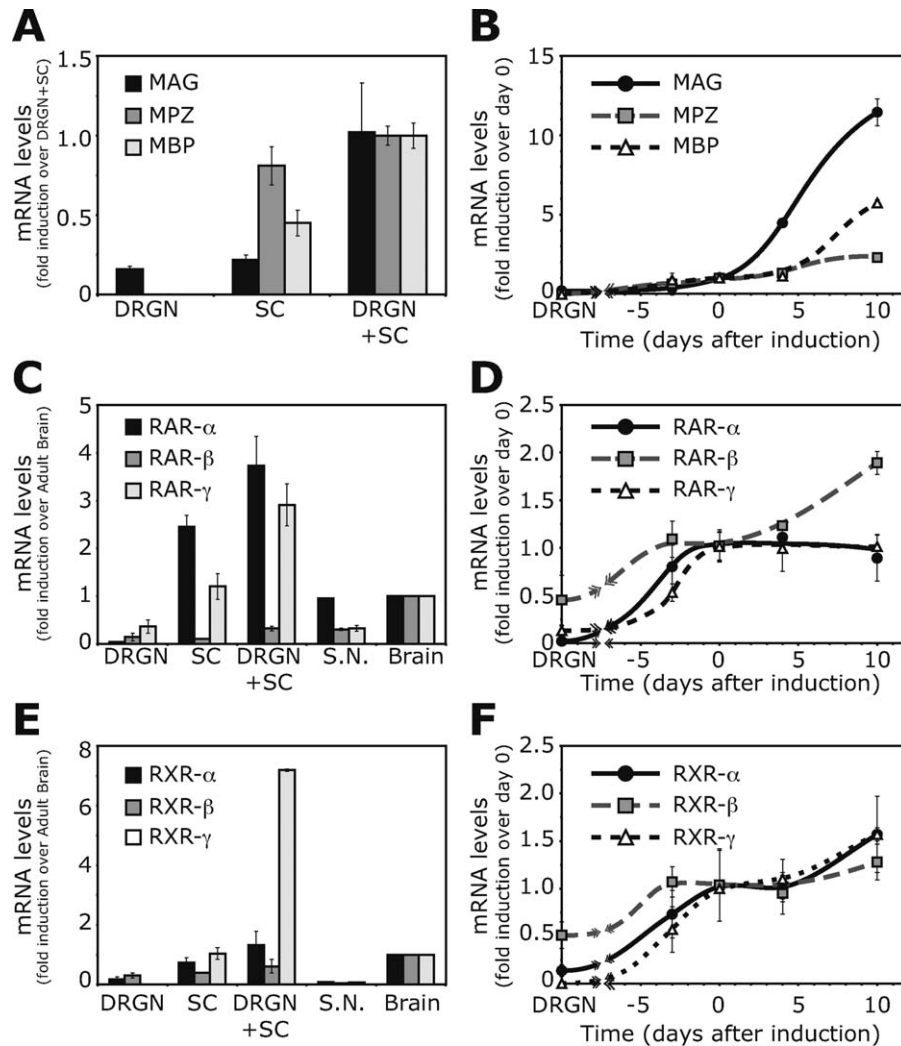


Fig. 3. Expression profiles of myelin genes and retinoid receptors during the myelination process in rat SC/DRGN cocultures. Isolated DRGNs, SCs, or cocultures (DRGN + SC) at different times during the myelination process were analyzed by RT-Q-PCR. SCs were seeded onto the neuronal cultures 7 days before induction of myelination with ascorbic acid (day 0). **A:** *Mag*, *Mpz*, and *Mbp* mRNA levels at the time of myelin induction (day 0) compared to isolated DRGNs and SCs. **B:** Expression levels of myelin genes during the myelination process in

DRGN/SC cocultures. mRNA levels of the RAR (**C**) and RXR (**E**) genes in DRGNs, SCs, and cocultures compared to newborn sciatic nerve (S.N.) and whole adult brain levels. Expression levels of RAR (**D**) and RXR (**F**) genes during the myelination process in DRGN/SC cocultures. The results are shown as the mean value  $\pm$  SD. In A, B, D, and F, the results are shown relative to the value in myelinating cocultures previously to ascorbic acid addition (day 0). In C and E, the values are shown as relative to total brain levels.

efficient as RA, effectively blocking myelin formation by almost 90%.

To further demonstrate that binding to RXR is a major contributor to RA effects on myelin formation, myelinating cocultures were treated with the natural retinoid in the presence or absence of LG101208, an RXR antagonist that blocks binding of RA to RXR without affecting binding to RAR (Diez del Corral and Storey, 2004) and that is able to block the activation of a RXRE by RA in SCs (Supp. Info. Fig. 6B). Although treatment with the RXR antagonist had no effect on myelin formation by itself, the antiretinoid was able to partially revert the inhibitory effect of RA (see Fig. 5).

Taken together, these results indicate that both RAR and RXR synergize to inhibit myelin formation; with RXR playing a major part.

### RA Upregulates Krox20 Without Affecting Other Transcription Factors

Myelin formation is under the control of a concerted network of transcription factors that are known to regulate several myelin genes and to drive the myelination program. To identify whether retinoic acid (RA) actions are due to the regulation of any of the known myelin-related transcription factors, myelinating cocultures, as well as isolated SCs, were treated with RA, and their relative levels were determined by RT-Q-PCR. First, we studied the promyelinating factors *Oct6*, *Brn2*, and *Sox10* that are involved in SC determination and commitment to myelination. RA practically did not modify their expression levels in myelinating cocultures (Fig. 6A) although the hormone was able to slightly increase

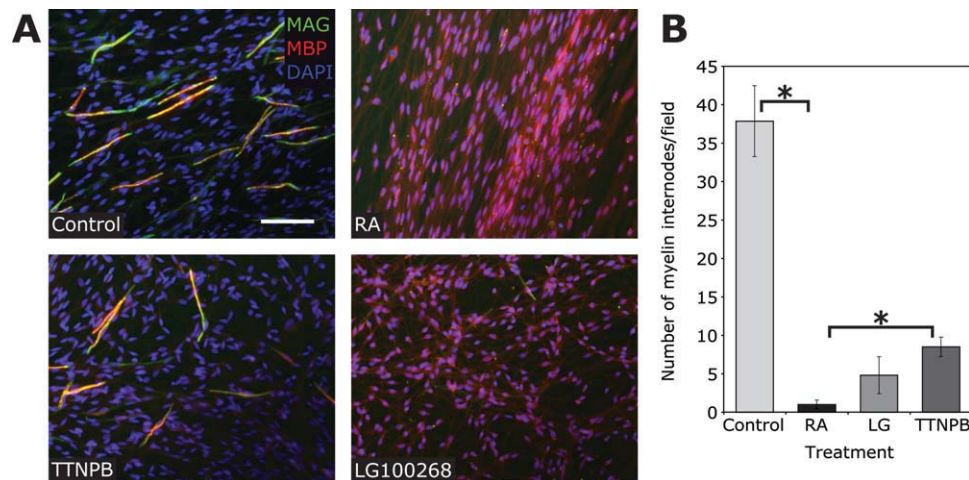


Fig. 4. Specific RXR activation is sufficient to fully inhibit myelin formation, whereas RAR activation only has a partial effect. **A:** Myelinating cocultures were induced to myelinate for 7 days in control conditions or in the presence of RA, the RAR agonist TTNPB, or the RXR agonist LG-100268, and myelin internodes were visualized by immunocytochemistry.

Scale bar, 100  $\mu$ m. **B:** The number of myelin internodes after treatment with the retinoids and rexinoids was quantified from at least three different fields for each condition. The results are shown as the mean value  $\pm$  SEM. \* $P < 0.001$  by Student's *t*-test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

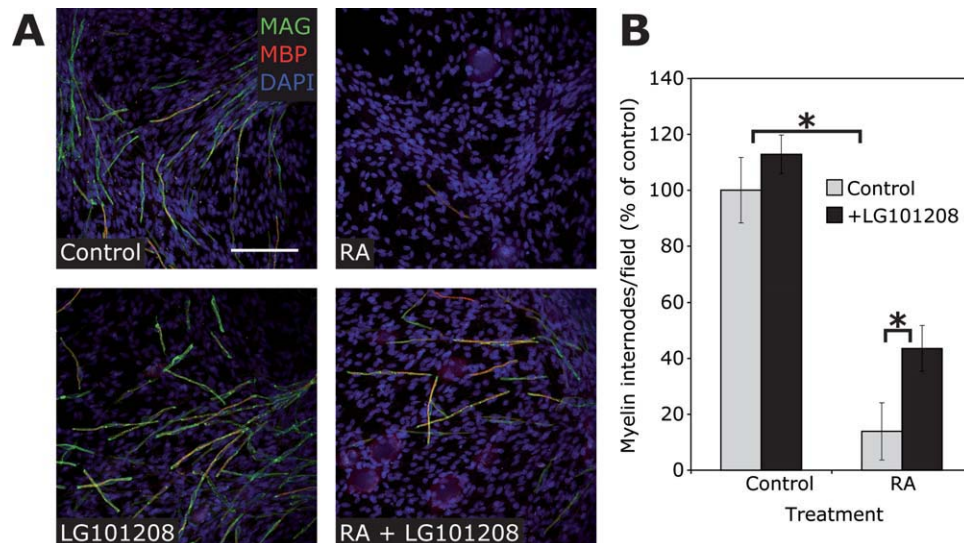


Fig. 5. Binding of RA to RXR is required to inhibit myelin formation. **A:** Myelinating cocultures were induced to myelinate for 7 days in control conditions or in the presence of RA, the RXR antagonist LG-101208 or a combination of both, therefore preventing RA binding to RXR and precluding myelin inhibition. Myelin formation was analyzed by immunocytochemistry followed by confocal microscopy. Scale bar,

100  $\mu$ m. **B:** The number of myelin internodes after treatment with RA and the antirexinoid was quantified from at least three different fields for each condition. The results are shown as the percentage of the mean value  $\pm$  SEM of the control. \* $P < 0.001$  by Student's *t*-test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

*Oct6* mRNA levels in SCs (Fig. 6B). We next analyzed the effect of the retinoid on *Krox20*, a transcription factor known to positively regulate several myelin genes, which is essential for the myelination program to proceed. Surprisingly, *Krox20* was strongly upregulated after RA-treatment both in myelinating cocultures as well as in purified SCs cultures. Finally, we studied the effect of the retinoid on *Sox2* and *cJun*, two transcription factors known to play a role as myelination inhibitors. RA did not have any remarkable effect on *cJun*, although it

did produce a reduction in *Sox2* mRNA levels, especially apparent in myelinating cocultures.

It has been described that *Krox20* is activated in SCs after axonal contact before myelination (Murphy et al., 1996; Topilko et al., 1994). To investigate if that holds true in our system, *Krox20* mRNA levels from myelin competent cocultures (in which SCs had been allowed to completely populate the axons and are ready to be induced with ascorbic acid) were compared to levels on isolated SCs as well as purified DRGN cultures. As it

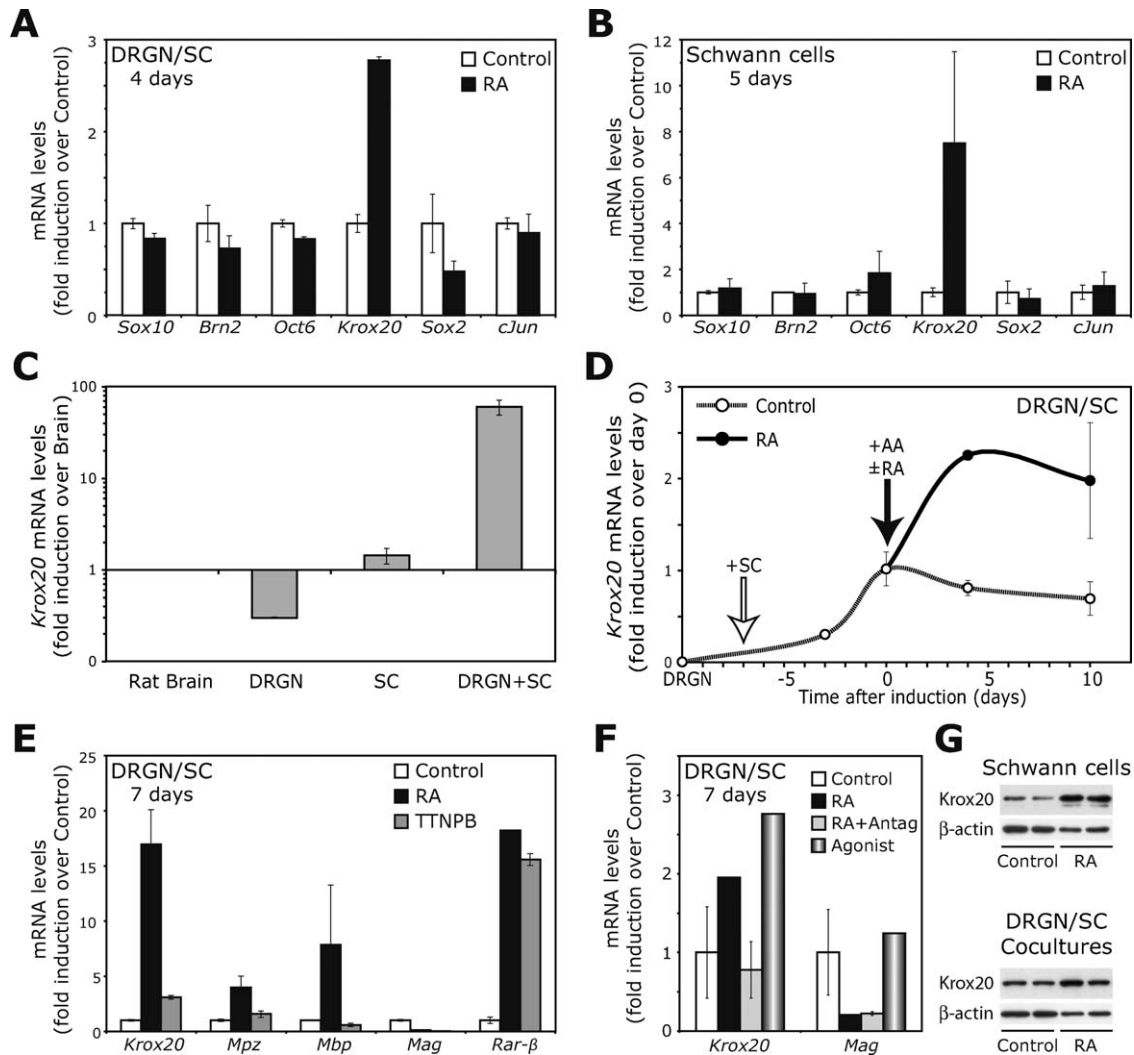


Fig. 6. Induction of *Krox20* expression by RA is mediated by RXR. RA induces *Krox20* expression in myelinating cocultures (A) or purified SCs (B), without showing a major effect on other myelination-relevant transcription factors. C: *Krox20* is expressed at much higher levels in myelination-competent cocultures than in isolated Schwann cells. *Krox20* mRNA levels were determined from total adult rat brain, purified DRGN, SCs, or DRGN/SC cocultures ready to myelinate. The results are related to the values found in adult rat brain. D: RA induces an overexpression of *Krox20* in myelinating cocultures. Purified SCs were seeded onto DRGN cultures 7 days before induction of myelination (empty arrow). At day 0 (black arrow), some cocultures were treated with RA 1  $\mu$ M concomitantly with the induction of myelination by ascorbic acid. *Krox20* mRNA levels were determined by RT-Q-PCR at different times along the course of the whole process. The results are

related to the value found at day 0. E: *Krox20* induction by RA in myelinating cocultures is accompanied by upregulation of the myelin genes *Mbp* and *Mpz*. On the other hand, the RAR agonist TTNPB does not affect *Krox20*, *Mbp*, or *Mpz* levels, although downregulation of *Mag*, as well as upregulation of the well-known RA-target gene *Rar-β*, is similar to the effect achieved with RA. F: The synthetic rexinoid LG100268 (agonist) induces *Krox20* without affecting *Mag* mRNA levels, whereas the RXR antagonist LG101208 blocks *Krox20* induction by RA without affecting *Mag* downregulation in myelinating cocultures. G: RA induces an increase in *Krox20* protein levels in both SC/DRGN myelinating cocultures or in isolated SCs after 7 days or 24 h of treatment, respectively. In (A–F), mRNA levels were determined by RT-Q-PCR. All values are shown as mean  $\pm$  SD of the fold induction over their respective controls.

can be seen from Figure 6C, *Krox20* levels in myelination-competent cocultures were more than 40 times higher than in isolated SC cultures. We next followed the increase in *Krox20* over the different stages of the myelination process. As shown in Figure 6D, *Krox20* levels are negligible in isolated DRGN and, after addition of the SCs (day –7), *Krox20* levels increase over time, probably due to the increase in the number of SCs in close contact with the axons, reaching a maximum around the time of ascorbic acid addition (day 0), in which the SCs have already completely populated the axons, and the proliferation has ceased. During the

whole process of active myelin formation (from day 0 to day 10), *Krox20* levels remain elevated and relatively constant. Addition of RA concomitantly with ascorbic acid produced an overexpression of *Krox20* levels from the already elevated levels found in the controls.

#### Krox20 Upregulation by RA Is Mediated by RXR and Correlates with *Mpz* mRNA Levels

To study if the potency of myelin inhibition by the different retinoids correlate with their ability to upregulate



Krox20 expression, myelinating cocultures were treated with retinoic acid (RA) or TTNPB, and the expression levels of *Krox20* and several myelin genes were determined by RT-Q-PCR.

As expected, RA produced a strong inhibition of *Mag* mRNA levels, whereas TTNPB had a similar or even larger inhibitory effect (Fig. 6E). On the other hand, RA produced a strong activation of *Krox20*, whereas TTNPB was only able to produce a significantly smaller effect. Concomitantly with *Krox20* induction, the major myelin protein genes *Mbp* and *Mpz*, which have been described to be under Krox20 transcriptional control, were also upregulated by RA treatment. Again, TTNPB treatment only had a marginal effect on both myelin genes. The relative failure of TTNPB to upregulate *Krox20*, *Mbp*, and *Mpz* was no due to a lower activity of the synthetic retinoid, because it was as potent as RA in upregulating *Rar-β* (a known RAR-dependent target of RA). On the other side, treatment with the RXR agonist LG100268 produced an increase in *Krox20* levels similar to the obtained with RA treatment (Fig. 6F), whereas cotreatment with the RXR antagonist LG101208 was able to abrogate *Krox20* induction mediated by RA. In agreement with the hypothesis of *Mag* been regulated through RAR, neither the RXR agonist affected *Mag* mRNA levels, nor the RXR antagonist interfered with its downregulation by RA.

To determine if the regulation of *Krox20* mRNA by RA can also be seen at the protein level, myelinating DRGN/SC cocultures or isolated SCs were treated with RA and *Krox20* protein levels were determined by western blot. As observed in Figure 6G, RA was able to increase *Krox20* protein levels both in isolated SCs and in myelinating cocultures.

The increase in *Krox20* mRNA levels in SCs was already evident at 25 nM RA (Supp. Info. Fig. 7), a dose at which myelin formation was already greatly impaired in myelinating cocultures. As *Krox20* upregulation was also observed in purified SCs devoid of axonal contact in the absence of basal lamina formation, we decided to analyze if *Mpz* and *Mag* could also be regulated by RA in isolated SCs. Treatment with 1 μM RA for 24 h was enough to produce a downregulation of *Mag* accompanied with an increase of *Mpz* mRNA levels, which indicates that neither axonal contact nor basal lamina formation is necessary for myelin gene regulation by RA (Supp. Info. Fig. 8). Additionally, nuclear *Krox20* immunostaining was higher in RA-treated isolated SCs than in control cultures, and this increase was accompanied with an induction of P<sub>0</sub> immunostaining (Supp. Info. Fig. 9).

Taken together, these results demonstrate that RXR activation by RA is both necessary and sufficient to induce *Krox20*, while RAR is mediating *Mag* inhibition.

### RA Treatment Induces an Adaptive ER Stress Response

The above results show that retinoic acid (RA) treatment does not hamper P<sub>0</sub> and MBP myelin proteins pro-

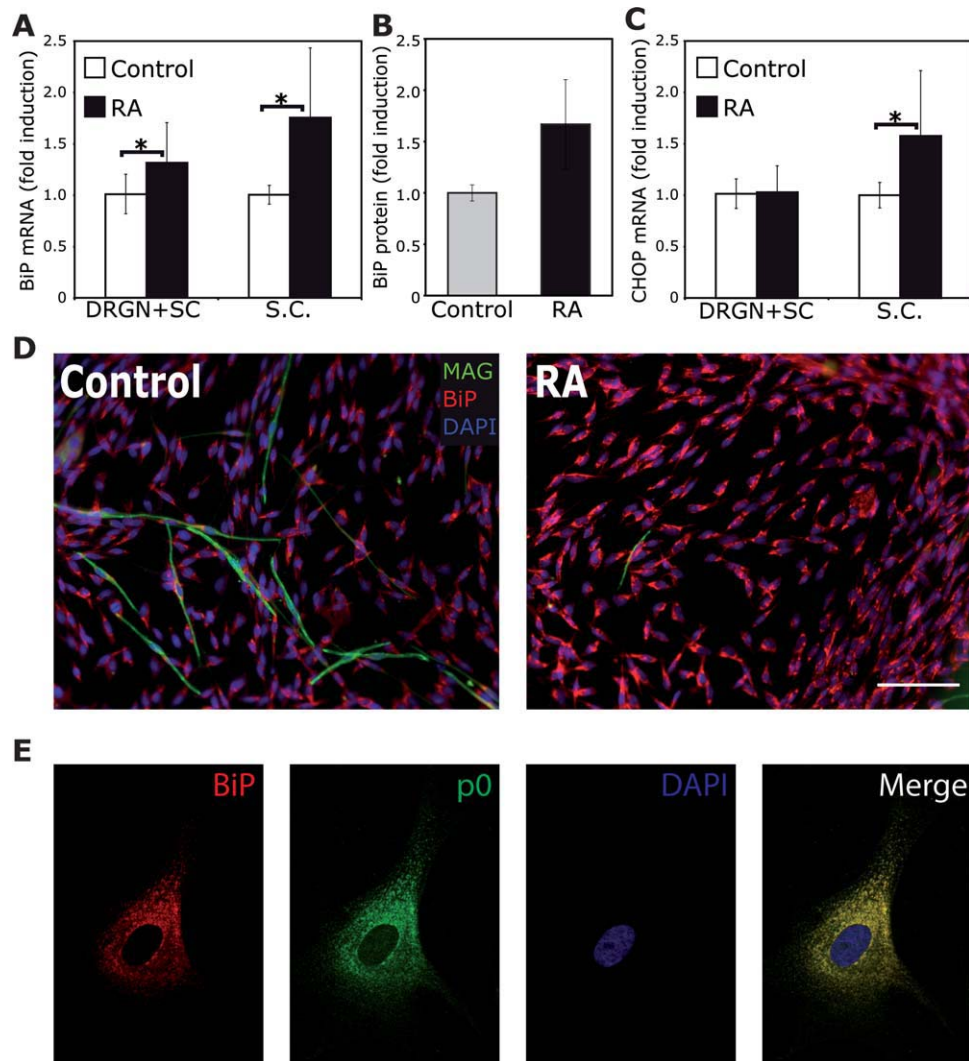
duction, which, in fact, is even increased. On the other hand, the proteins do not reach the myelin compartment in the plasma membrane. As it has been described that the expression of myelin proteins without proper myelin sheath formation can initiate an ER stress response similar to the unfolded protein response (UPR), we investigated if two of the UPR hallmarks, namely induction of BiP and CHOP expression, also occur in our paradigm. Myelinating cocultures and purified SC primary cultures were treated with RA, and the relative levels of the chaperone BiP and the transcription factor CHOP mRNAs were determined by Q-RT-PCR. RA produced a small (less than twofold), but statistically significant increase of BiP and CHOP mRNA levels in primary SCs (see Fig. 7). On the other hand, an increase in BiP mRNA levels can also be seen in myelinating cocultures after RA treatment, whereas CHOP mRNA levels remain unchanged. The former result is probably due to the fact that CHOP mRNA levels are relatively much higher in DRG neurons than in SCs (Supp. Info. Fig. 10), therefore masking any possible effect that the retinoid could have in the glial cells present in the cocultures. This increase in BiP mRNA levels in myelinating cocultures correlated with an increase at the protein level as revealed by both western blot (Fig. 7B) and immunostaining (Fig. 7D). We next analyzed if this increase in BiP correlated with its association with myelin proteins in the ER. In isolated SCs, RA induced an increase in BiP immunostaining without changing the ER-like pattern observed in control conditions. This was accompanied with an increase in P<sub>0</sub> immunostaining that presented a strong colocalization with BiP (Fig. 7E).

These results indicate that RA-induced myelin protein overexpression initiates an adaptive ER stress response characterized by the induction of a mild UPR program.

## DISCUSSION

The formation of the myelin sheath in the PNS depends on a complex interplay between SCs and neurons regulated by a series of extracellular stimuli that coordinate the behavior of both cell types. Our results demonstrate that retinoids also participate in the regulatory networks that influence myelin formation in the PNS. In fact, RA negatively regulates myelin formation although this is achieved through two apparently conflicting pathways: on one side, RA strongly inhibits the expression of the myelin gene *Mag*; on the other side, RA induces the expression of several other myelin genes, like *Mbp* or *Mpz*.

RA blockade of myelin formation does not correlate with changes in the promyelogenic transcription factors *Brn2*, *Sox10*, and *Oct6*; indicating that the retinoid does not interfere with the earlier stages of SC differentiation or commitment to myelination. Strikingly, the myelinogenic transcription factor *Krox20* is highly upregulated by the retinoid, both in myelinating cocultures as well as in isolated SCs cultures. As expected from *Krox20* increased levels, RA also regulates several genes



**Fig. 7.** RA upregulates BiP and CHOP in Schwann cells. **A:** RA increases BiP mRNA levels in myelinating DRGN/SC cocultures and in purified SCs after 7 days or 24 h of treatment, respectively. The values are shown as mean  $\pm$  SD of the fold induction over their respective controls from at least two experiments performed in duplicate.  $*P < 0.01$  by Student's *t*-test. **B:** RA increases BiP protein levels. Myelinating DRG/SC cocultures were treated with 1  $\mu$ M RA for 7 days, and the levels of BiP present in the cocultures were determined by western blot. The results are shown as the mean value  $\pm$  SEM of the fold induction over their respective controls. **C:** RA increases CHOP mRNA levels in primary SCs cultures but not in myelinating DRGN/SC cocultures. mRNA levels were

determined by RT-Q-PCR. The values are shown as the mean  $\pm$  SD of the fold induction over their respective controls from at least two experiments performed in duplicate.  $*P < 0.01$  by Student's *t*-test. **D:** RA increases BiP immunoreactivity. Myelinating DRG/SC cocultures were treated with 1  $\mu$ M RA for 7 days, and the levels of BiP and MAG proteins were analyzed by immunocytochemistry. Scale bar, 100  $\mu$ m. **E:** P<sub>0</sub> colocalizes with BiP in Schwann cells. Purified Schwann cells were treated with 1  $\mu$ M RA for 24 h, and the localization of BiP and P<sub>0</sub> was analyzed by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

whose expression is controlled by this transcription factor, including myelin genes, such as *Mpz* (Zorick et al., 1999) or *Mbp* (Nagarajan et al., 2001) as well as the negatively regulated demyelinating/dysmyelinating gene *Sox2* (Le et al., 2005).

Taken altogether, there is an evident uncoupling of the morphological effect observed with RA treatment, characterized by a dysmyelinating phenotype, from the molecular profile obtained, with an increase in the myelinogenic transcription factor *Krox20*, the inhibition of the demyelinating gene *Sox2*, and, what is more relevant, the elevation of *Mbp* and *Mpz* mRNAs.

This increase in myelin genes expression is reminiscent of what can be observed in CMT animal models.

*Pmp22* duplication is the most common cause of CMT neuropathies (Barisic et al., 2008), and its overexpression causes dysmyelination *in vivo* (Huxley et al., 1998; Robaglia-Schlupp et al., 2002) and *in vitro* (Nobbio et al., 2004). In *Pmp22* transgenic mice, PMP22 itself, as well as other myelin proteins, remains at similar levels than in wild-type animals but, in the absence of myelin as a receiving compartment, they are targeted to intracellular regions (Niemann et al., 2000). Also, it has been described that PMP22 is upregulated by RA in neural crest primary cultures (Wang et al., 2005), from which SCs can originate. Similarly, *Mpz* overexpression also causes PNS hypomyelination (Wrabetz et al., 2000) due to missorting of P<sub>0</sub> protein (Yin et al., 2000). In



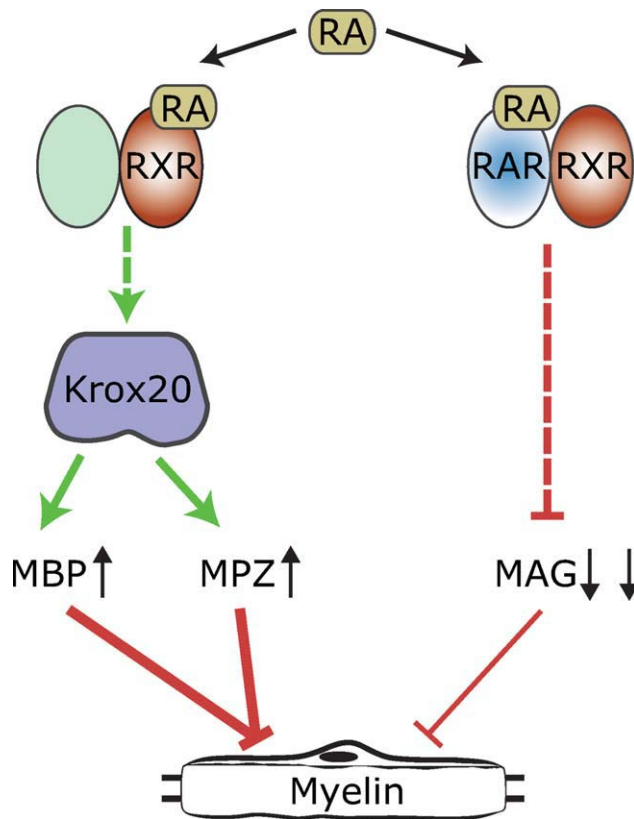


Fig. 8. Model for RA regulation of myelin formation through RAR and RXR. RA bound to RXR, either as a homodimer or as a heterodimer with other nuclear receptor, upregulates Krox20 expression, which, in turn, directly regulates MBP and MPZ, whose overexpression inhibits the myelination process. At the same time, RA bound to RAR blocks MAG expression, whose deficit also contributes to myelin inhibition. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

addition, the lack of correlation between *Mpz* mRNA levels (which are consistently elevated after RA treatment) and  $P_0$  protein levels (with a high degree of variability from experiment to experiment or from animal to animal, as manifested by an unusually high-standard deviation compared to other protein determinations in the same experiments) is in agreement with what has been observed in *Mpz* transgenic mice, whose severity in the dysmyelinating phenotype correlates well only with the increase in *Mpz* mRNA but not with  $P_0$  protein levels (Wrabetz et al., 2000). A mild mRNA overexpression implies a small increase in  $P_0$  levels with low-myelin affection, whereas a strong overexpression has a deleterious effect characterized by a complete myelin blockade accompanied by a decrease in total  $P_0$  protein levels.

Considering that Krox20 downregulation also results in a block in the myelination program (Le et al., 2005; Topilko et al., 1994), a plausible explanation for all the above observations is that Krox20 levels have to be tightly regulated for the myelination process to proceed with normalcy and its upregulation by RA produces a transcriptional imbalance that translates into myelin inhibition. Elevated levels of Krox20 produce an increase in several myelin proteins, whose overexpres-

sion could be the ultimate culprits of the observed dysmyelinating phenotype.

In agreement with the possible deleterious effect of myelin protein overexpression, we observe a mild UPR response in SCs treated with RA. The extent of BiP induction by RA is similar to the one obtained by  $P_0$  overexpression in the nerves of *Mpz* transgenic animals (Pennuto et al., 2008; Wrabetz et al., 2006), which constitutes yet another parallelism between our results and the mouse model. Such a minor induction of BiP and CHOP, compared to the robust UPR response that can be observed after expression of ER-retained mutant  $P_0$  proteins, could indicate that RA induces an adaptive cellular stress response in which the SC is still trying to cope with the ER stress, and so a full UPR proapoptotic response is not being fired. In agreement with this, RA treatment does not induce any apparent increase in SC apoptosis, which usually is the final outcome of a full-fledged UPR program in myelinating cells (Lin and Popko, 2009).

On the other hand, our results clearly indicate that retinoids influence myelin formation through its binding to both families of nuclear receptors, RARs as well as RXRs. RAR occupancy is sufficient to inhibit MAG accumulation and to partially inhibit myelin internode formation, but RXR occupation is both necessary and sufficient for a complete myelination block. To our knowledge, this is one of the few examples of RA acting predominantly through RXR and not RAR, not only in the PNS, but also in any physiologically relevant biological process. The partial myelin inhibition observed with TTNPB in SC/DRGN cocultures, together with the almost absent *Krox20* and *Mpz* induction, provides additional support for the hypothesis of Krox20 overexpression being the major cause for the RA-induced dysmyelinating phenotype.

On top of the RXR-mediated upregulation of *Krox20*, RA downregulates MAG, which can also contribute, although only partially, to inhibit myelination. This second mechanism is RAR-dependent, because it can be perfectly mimicked by TTNPB and not by an RXR-specific retinoid. Initial studies reported that MAG promotes the initial steps, and it is required for PNS myelin formation in rat myelinating cocultures (Owens and Bunge, 1991; Owens et al., 1990). Strikingly, MAG-deficient mice display an almost normal PNS myelin *in vivo* (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). Additionally, *in vitro* myelination of DRG explants from *MAG*<sup>-/-</sup> mice proceeds with normalcy, although at a lower rate than in explants from wild-type mice (Carenini et al., 1998). The discrepancy among those studies has not been satisfactorily explained yet. One possibility is that different species could have a different susceptibility to MAG dysfunction, and so mice are able to adequately compensate for MAG deficiency, whereas rats are not. In that sense, it has been described that genetic background has an influence on the outcome of MAG deficiency on CNS and PNS myelination (Pan et al., 2005). The loss of Mag expression in response to RA is somehow puzzling considering that it has been described as a positively regu-

lated Krox-20 transcriptional target (Nagarajan et al., 2001), although most probably it just denotes the fact that RAR-mediated *Mag* downregulation is stronger than RXR/Krox-20-dependent upregulation. We are currently studying the mechanisms that mediate *Mag* downregulation in response to RA.

In conclusion, our results can be summarized in a model depicted in Figure 8, in which RA binding to RAR produces a decrease in MAG levels that have a partial inhibitory role on myelination. On the other hand, RA also binds to RXR that, alone as a homodimer or in conjunction with other nuclear receptor, produces an increase in Krox20 that positively regulates several myelin genes, whose overexpression blocks internode formation. RAR belongs to the Class I subfamily of nuclear receptors, which also includes, among others, the vitamin D3, the peroxisome proliferator activated, or the thyroid hormone receptors. All of them act by heterodimerizing with RXR (that belongs to the Class II subfamily), which can also operate as a homodimer (Aranda and Pascual, 2001). Further studies need to be conducted to determine whether RXR-dependent regulation of myelination is mediated by homodimers or if it is acting just as a heterodimerizing partner for other nuclear receptor. On the other hand, all three RXR genes are highly expressed on SCs, which precluded us from determining if RA effects on peripheral myelination are mediated by a particular isoform. Also, as early as birth, their abundance in sciatic nerve is already much lower than in isolated SCs, and their levels keep decreasing over time during sciatic nerve development coincidentally with the maximum of myelin formation, reinforcing the notion that RXR acts as a regulator of peripheral myelin formation. Regarding this, only RXR- $\alpha$  null-mice are not viable and show a clear phenotype. In fact, even the triple compound RXR- $\alpha^{+/-}$ /RXR- $\beta^{-/-}$ /RXR- $\gamma^{-/-}$  mutant mice are viable and almost indistinguishable from RXR- $\alpha^{+/-}$  mice (Krezel et al., 1996), suggesting that all three isoforms are basically interchangeable, making more difficult to study the involvement of RXR on myelin formation *in vivo*. Animal models of forced overexpression after birth as well as conditional knock-outs of the different RXR isoforms on SCs should provide further mechanistic insights into the role of RXR on Schwann cell differentiation and subsequent peripheral myelin formation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ligand Pharmaceuticals Inc. for providing the rexinoid LG-100268 and the anti-rexinoid LG-101208. We also thank Ignacio Lozano for his technical assistance with mice and the electron microscopy analysis.

## REFERENCES

Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269–1304.

- Aström A, Pettersson U, Krust A, Chambon P, Voorhees JJ. 1990. Retinoic acid and synthetic analogs differentially activate retinoic acid receptor dependent transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 173:339–345.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* 168:342–357.
- Barisic N, Claeys KG, Sirotković-Skerlev M, Löfgren A, Nelis E, De Jonghe P, Timmerman V. 2008. Charcot-Marie-Tooth disease: A clinico-genetic confrontation. *Ann Hum Genet* 72(Pt 3):416–441.
- Barres BA, Lazar MA, Raff MC. 1994. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120:1097–1108.
- Boehm MF, Zhang L, Zhi L, McClurg MR, Berger E, Wagoner M, Mais DE, Suto CM, Davies JA, Heyman RA. 1995. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J Med Chem* 38:3146–3155.
- Cañón E, Cosgaya JM, Scucova S, Aranda A. 2004. Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15:5583–5592.
- Carenini S, Montag D, Schachner M, Martini R. 1998. MAG-deficient Schwann cells myelinate dorsal root ganglion neurons in culture. *Glia* 22:213–220.
- Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM. 2001. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14661–14668.
- Corcoran J, Maden M. 1999. Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci* 2:307–308.
- Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. 2002. The neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> as a positive modulator of myelination. *Science* 298:1245–1248.
- Cosgaya JM, Garcia-Villalba P, Perona R, Aranda A. 1996. Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation, differentiation, and gene expression. *J Neurochem* 66:89–98.
- Cosgaya JM, Perona R, Aranda A. 1997. Retinoic acid induces secretion of transforming growth factors by PC12 pheochromocytoma cells. *Oncogene* 14:579–587.
- Diez del Corral R, Storey KG. 2004. Opposing FGF, retinoid pathways: A signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26:857–869.
- Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 61:267–304.
- Haussler M, Sidell N, Kelly M, Donaldson C, Altman A, Mangelsdorf D. 1983. Specific high-affinity binding and biologic action of retinoic acid in human neuroblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5525–5529.
- Huxley C, Passage E, Robertson AM, Youl B, Huston S, Manson A, Sabéran-Djoniédi D, Figarella-Branger D, Pellissier JF, Thomas PK, et al. 1998. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 7:449–458.
- Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. 1996. RXR $\gamma$  null mice are apparently normal and compound RXR $\alpha^{+/-}$ /RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\gamma^{-/-}$  mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9010–9014.
- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. 2005. Analysis of congenital hypomyelinating Egr2<sup>Lo/Lo</sup> nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2596–2601.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp BD, Peterson A, Roder J. 1994. Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369:747–750.
- Lin W, Popko B. 2009. Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells. *Nat Neurosci* 12:379–385.
- Maden M. 2007. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8:755–765.
- Mey J, Schrage K, Wessels I, Vollpracht-Crijns I. 2007. Effects of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  on the intracellular localization of retinoid receptors in Schwann cells. *Glia* 55:152–164.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Blüthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA. 1994. Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229–246.
- Murphy J, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Seitanidou T, Baron-Van Evercooren A, Charnay P. 1996. The regulation of Krox-20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development* 122:2847–2857.
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. 2001. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30:355–368.
- Niemann S, Sereda MW, Suter U, Griffiths IR, Nave KA. 2000. Uncoupling of myelin assembly and schwann cell differentiation by trans-

- genic overexpression of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci* 20:4120–4128.
- Nobbio L, Vigo T, Abbruzzese M, Levi G, Brancolini C, Mantero S, Grandis M, Benedetti L, Mancardi G, Schenone A. 2004. Impairment of PMP22 transgenic Schwann cells differentiation in culture: Implications for Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Neurobiol Dis* 16:263–273.
- Noll E, Miller RH. 1994. Regulation of oligodendrocyte differentiation: A role for retinoic acid in the spinal cord. *Development* 120:649–660.
- Owens GC, Boyd CJ, Bunge RP, Salzer JL. 1990. Expression of recombinant myelin-associated glycoprotein in primary Schwann cells promotes the initial investment of axons by myelinating Schwann cells. *J Cell Biol* 111:1171–1182.
- Owens GC, Bunge RP. 1991. Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin. *Neuron* 7:565–575.
- Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. 2005. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS, PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol* 195:208–217.
- Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'antonio M, Ron D, Quattrini A, Feltri ML, Wrabetz L. 2008. Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* 57:393–405.
- Robaglia-Schlupp A, Pizant J, Norreel JC, Passage E, Sabéran-Djoneidi D, Ansaldi JL, Vinay L, Figarella-Branger D, Lévy N, Clarac F, et al. 2002. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice. *Brain* 125(Pt 10):2213–2221.
- Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA. 1991. Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP-dependent protein kinase. *J Cell Biol* 113:1173–1182.
- Svaren J, Meijer D. 2008. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* 56:1541–1551.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chen-noufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371:796–799.
- Trapp BD, Quarles RH. 1982. Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin. *J Cell Biol* 92:877–882.
- Wang L, Mear JP, Kuan CY, Colbert MC. 2005. Retinoic acid induces CDK inhibitors and growth arrest specific (Gas) genes in neural crest cells. *Dev Growth Differ* 47:119–130.
- Wrabetz L, D'Antonio M, Pennuto M, Dati G, Tinelli E, Fratta P, Previtali S, Imperiale D, Zielasek J, Toyka K, et al. 2006. Different intracellular pathomechanisms produce diverse myelin protein zero neuropathies in transgenic mice. *J Neurosci* 26:2358–2368.
- Wrabetz L, Feltri ML, Quattrini A, Imperiale D, Previtali S, D'Antonio M, Martini R, Yin X, Trapp BD, Zhou L, et al. 2000. P<sub>0</sub> glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves. *J Cell Biol* 148:1021–1034.
- Yin X, Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, Trapp BD. 2000. Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P<sub>0</sub> protein. *J Cell Biol* 148:1009–1020.
- Zhelyaznik N, Mey J. 2006. Regulation of retinoic acid receptors  $\alpha$ ,  $\beta$  and retinoid X receptor  $\alpha$  after sciatic nerve injury. *Neuroscience* 141:1761–1774.
- Zhelyaznik N, Schrage K, McCaffery P, Mey J. 2003. Activation of retinoic acid signalling after sciatic nerve injury: Up-regulation of cellular retinoid binding proteins. *Eur J Neurosci* 18:1033–1040.
- Zorick TS, Syroid DE, Brown A, Gridley T, Lemke G. 1999. Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* 126:1397–1406.